

Molekulare Funktion und Regulation des spannungsabhängigen Natriumkanals Na_v1.8

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Biochemikerin Jana Schirmeyer

geboren am 20. August 1983 in Greifswald

Gutachter:

1. Prof. Dr. Stefan H. Heinemann (Institut für Biochemie und Biophysik, Jena)
2. PD Dr. Dieter Wicher (Max Planck Institut für chemische Ökologie, Jena)
3. Prof. Dr. med. Carla Nau (Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Lübeck)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.08.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	2
1.1 Spannungsgesteuerte Natriumkanäle	2
1.1.1 Genfamilie der spannungsgesteuerten Natriumkanäle	2
1.1.2 Struktur und Funktion von Na _v -Kanälen	3
1.1.3 Kinetische Beschreibung der Schaltprozesse	6
1.1.4 Der Öffnungsvorgang bei Na _v -Kanälen	7
1.1.5 Funktionelle Modulierbarkeit von Na _v -Kanälen	9
1.1.5.1 Na _v -Kanal-spezifische Neurotoxine	10
1.1.5.2 Oxidationssensitivität von Na _v -Kanälen	12
1.2 Der spannungsabhängige Natriumkanal Na_v1.8	13
1.2.1 Physiologische Bedeutung im peripheren Nervensystem	13
1.2.2 Physiologische Bedeutung von Na _v 1.8 im Herzen	14
1.2.3 Na _v 1.8-assoziierte Phänotypen der Maus	14
1.2.4 Besonderheiten im Schaltverhalten von Na _v 1.8	14
1.2.5 Molekulare Pharmakologie von Na _v 1.8	15
1.2.6 Modulation von Na _v 1.8 durch intrazelluläre Mechanismen	16
1.2.6.1 N- und C-Termini als Regulatoren der Expressionsstärke	16
1.2.6.2 Interaktion mit intrazellulären Proteinen	17
1.2.6.3 Alternatives Spleißen	17
1.3 Zielstellung dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Molekularbiologische Methoden	19
2.1.1 Expressionsplasmide, Kanalkonstrukte und Mutanten	19
2.1.2 Mutagenese und DNA-Präparation	22
2.2 Zellkultur, Transfektion und Bildgebung	24
2.3 Elektrophysiologische Arbeiten	24
2.3.1 Die Methode der Spannungsklemme	24
2.3.2 Messlösungen und applizierte Substanzen	25
2.3.2.1 Chemikalien	26
2.3.2.2 Toxine	27
2.3.3 Datenaufnahme und -analyse	27
2.3.3.1 Schalteigenschaften von Na _v -Kanälen	27
2.3.3.2 Substanzapplikation	30
2.3.4 Endogene Natriumströme neuronaler Zellen	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Na_v1.8 im Vergleich mit Na_v1.4	33
3.1.1 Na _v 1.4 und Na _v 1.8 in Neuro-2A-Zellen	33
3.1.2 Vergleich von rNa _v 1.8 und hNa _v 1.8 in ND7/23-Zellen	36

3.2	Molekulare Determinanten des Nav1.8-spezifischen Aktivierungsverhaltens	36
3.2.1	Schaltverhalten von Nav1.4/Nav1.8-Chimären	36
3.2.2	Aktivierungsschaltverhalten nach Entfernung der schnellen Inaktivierung	42
3.2.2.1	Aktivierung von Nav1.4 und Nav1.8	42
3.2.2.2	Aktivierungsschaltverhalten der Nav1.4/Nav1.8-Chimären	45
3.2.2.3	rNav1.8-KK726 und KK747 sind am Aktivierungsschaltvorgang beteiligt	49
3.2.3	Direkte Beeinflussung des Aktivierungsvorganges	51
3.2.3.1	Intrazelluläre Ladungen – Neomycin	51
3.2.3.2	Spannungssensortoxine μ O-MrVIA und β -Tz1	53
3.2.4	Beeinflussung der Kopplung der Schaltprozesse	59
3.2.4.1	δ -Conotoxine	59
3.2.4.2	Skorpion α -Toxine	62
3.3	Oxidationssensitivität von Nav1.8	64
3.3.1	Beeinflussung von Nav1.4 und Nav1.8 durch Chloramin-T	64
3.3.2	rNav1.8_IFM und IFL unter Chloramin-T	65
3.3.3	Einfluss von ChT auf Nav1.4/Nav1.8 Chimären	66
3.3.4	Spannungsabhängigkeit des ChT Effektes	68
3.4	Spleißvarianten von hSCN10A	69
3.4.1	Identifikation und Quantifizierung	69
3.4.2	Elektrophysiologische Beschreibung	70
3.4.2.1	hNav1.8–Q	70
3.4.2.2	hNav1.8–e11	71
3.4.3	Einfluss alternativen Spleißens auf die Expressionsstärke	73
3.5	Expressionsregulation bei Nav1.8	75
3.5.1	Einfluss des Kanal-C-Terminus	78
3.5.2	Einfluss des Kanal-N-Terminus	80
4	Diskussion	81
4.1	Verwendete Methodik	81
4.2	Schaltverhalten von rekombinanten Nav1.8-Kanälen	82
4.2.1	Nav1.4/Nav1.8 Domänen-Chimären	85
4.2.2	Isolierte Betrachtung der Aktivierung	86
4.2.3	Lysin-Doppelmotive in D2 von Nav1.8 modulieren die Aktivierung	89
4.3	Molekulare Pharmakologie von Nav1.8	92
4.3.1	Aktivierungsmodifizierende Toxine	92
4.3.2	Inaktivierungsmodifizierende Toxine	93
4.4	Modulation des Nav1.8-Gesamtstromes durch Oxidation	93
4.5	Unterschiede zwischen Nav1.8 des Menschen und der Ratte	97

4.6	Expression von Nav1.8 in nicht-neuronalen Zellen	97
4.7	Spleißvarianten von hSCN10A	99
4.7.1	Exon 11 -Skipping	99
4.7.2	NAGNAG Tandem-Spleiß-Akzeptor	101
5	Zusammenfassung	103
6	Literaturverzeichnis	107
	Danksagung	116
	Ehrenwörtliche Erklärung	117
	Anhang	118

Abkürzungen

AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
CaM	Calmodulin
ChT	Chloramin-T
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	<i>dorsal root ganglia</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTNP	2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FSK	Forskolin
HEK293	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HUGO	Human Genome Organisation
Idx	Index
LY	<i>Lucifer Yellow</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MetO	Methioninsulfoxid
Nav-Kanal	spannungsgesteuerter Natriumkanal
Norm. I	normalisierte Stromamplitude
nt	Nukleotid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKA	Proteinkinase A
PNS	peripheres Nervensystem
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RS	<i>receptor site</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Spannungsgesteuerte Natriumkanäle

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (*voltage-gated sodium channels*, Nav-Kanäle) sind die Plasmamembran durchspannende Proteine mit einer zentralen, besonders für Natrium-Ionen (Na^+) durchlässigen, Pore. Das Öffnen dieser Pore ist abhängig von der über der Membran anliegenden Spannung, der Durchtritt der Ionen erfolgt passiv. Nav-Kanäle vermitteln die schnelle Depolarisation der Zellmembran, welche zur Auslösung und Fortpflanzung von Aktionspotentialen und damit für die Erregungsleitung notwendig ist (Catterall, 1992). Aktionspotentiale werden von erregbaren Zellen wie Neuronen und Muskelzellen, aber auch von Sinneszellen ausgebildet. Natriumkanäle spielen somit eine entscheidende Rolle in vielen Lebensvorgängen. Sie sind beteiligt an der Wahrnehmung der Umwelt (Sinne, Verarbeitung der Reize im Gehirn) und der entsprechenden Reaktion (Muskulararbeit), sowie an der Aufrechterhaltung der autonomen Lebensvorgänge (z. B. Herzschlag). Um diesen vielfältigen Aufgaben gerecht zu werden, werden verschiedene Typen von Natriumkanälen benötigt. Diese werden gewebespezifisch und teils in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand eines Säugetieres exprimiert und zeichnen sich durch individuelle elektrophysiologische und pharmakologische Eigenschaften aus.

1.1.1 Genfamilie der spannungsgesteuerten Natriumkanäle

Es sind zehn Natriumkanal-Gene bei Säugern gefunden und kloniert wurden. Nav1.1 – Nav1.9 wurden in ihrer Funktion als spannungsgesteuerte Natriumkanäle in isolierten Systemen untersucht (Plummer & Meisler, 1999; Goldin, 2002). Einem weiteren Vertreter der Genfamilie, Nav2.1 oder NaX, wird eine Rolle als Salzsensoren in der Zelle zugeschrieben (Hiyama *et al.*, 2002). Die zugehörigen Gene der Nav-Kanäle sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und sind vermutlich durch Genduplikation entstanden (Goldin, 2002). Einige Kanäle werden sehr gewebespezifisch exprimiert. Hervorzuheben sind besonders Kanäle mit ausgesprochen spezifischer Expression: Nav1.8 wird hauptsächlich in afferenten Neuronen der Hinterwurzelganglien gebildet, Nav1.5 hingegen ist der vorherrschende Nav-Kanaltyp im Herzmuskel (Plummer & Meisler, 1999). Hingegen findet man Nav1.3 ubiquitär.

Abb. 1-1 veranschaulicht die Ähnlichkeit der Natriumkanäle auf Proteinebene und deren bevorzugten Expressionsort, sowie den Namen des kodierenden Gens und den Gen-Lokus beim Menschen.

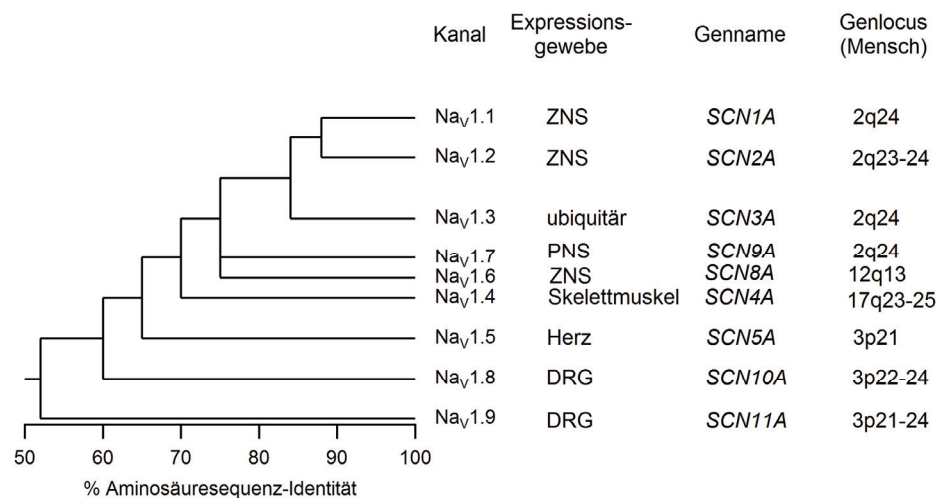


Abb. 1-1 Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit der neun humanen Na_v-Kanäle, exprimierendes Gewebe, sowie Bezeichnung (HUGO) und chromosomale Lokalisation der kodierenden Gene (die Berechnung der Sequenzidentitäten erfolgte unter Berücksichtigung der kompletten Sequenz, weitere Angaben aus Plummer and Meisler (1999)). Abkürzungen: ZNS – Zentralnervensystem, PNS – Peripheres Nervensystem, DRG – *Dorsal root ganglia* (Hinterwurzelganglien)

1.1.2 Struktur und Funktion von Na_v-Kanälen

Alle spannungsgesteuerten Natriumkanäle sind membranständige Proteine, gebildet aus einer für die Funktion essentiellen α -Untereinheit und zusätzlichen β -Untereinheiten (Abb. 1-2). Die α -Untereinheit besteht je nach Kanaltyp aus etwa 2000 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von ~260 kDa. Diese α -Untereinheit kann mit optionalen β -Untereinheiten (30-40 kDa) assoziiert sein, welche nicht-kovalent (β_1 und β_3) oder kovalent über Disulfidbrücken (β_2 und β_4) mit der α -Untereinheit verbunden sind (Patino & Isom, 2010). Die β -Untereinheiten sind für die Bildung eines funktionstüchtigen Kanals nicht essentiell, können aber sowohl das Schaltverhalten des Kanals verändern (Chahine & O'Leary, 2011), als auch den Transport der α -Untereinheit in die Zellmembran (Zhang *et al.*, 2008) oder die Wirkung von Toxinen auf den Kanal (Wilson *et al.*, 2011) beeinflussen.

Die α -Untereinheit ist zu vier homologen Domänen (D1-D4) gruppiert, die jeweils aus sechs vollständigen helikalen Membrandurchgängen (S1-S6) bestehen. Alle Transmembransegmente sind durch intra- bzw. extrazelluläre Schleifen verbunden. N- und C-Terminus der Kanalproteine befinden sich intrazellulär (Abb. 1-2).

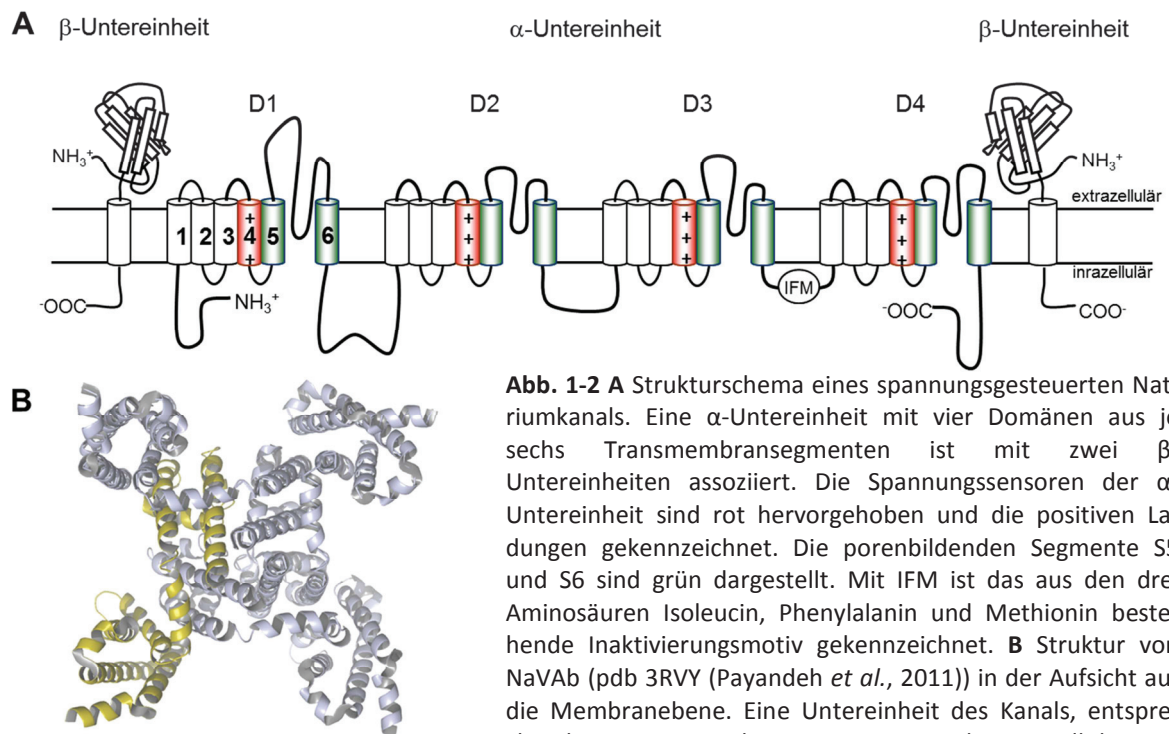


Abb. 1-2 A Strukturschema eines spannungsgesteuerten Natriumkanals. Eine α -Untereinheit mit vier Domänen aus je sechs Transmembransegmenten ist mit zwei β -Untereinheiten assoziiert. Die Spannungssensoren der α -Untereinheit sind rot hervorgehoben und die positiven Ladungen gekennzeichnet. Die porenbildenden Segmente S5 und S6 sind grün dargestellt. Mit IFM ist das aus den drei Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin bestehende Inaktivierungsmotiv gekennzeichnet. **B** Struktur von NaVAb (pdb 3RVY (Payandeh *et al.*, 2011)) in der Aufsicht auf die Membranebene. Eine Untereinheit des Kanals, entsprechend einer Domäne bei Säuger- Na_v -Kanälen, ist gelb hervorgehoben.

Das S4-Segment jeder Domäne besitzt 4-8 positiv geladene Aminosäurereste (meist Arginin, auch Lysin) gefolgt von je zwei hydrophoben Resten angeordnet in einer α -Helix. Somit kann das Protein auf Änderungen des elektrischen Feldes über der Zellmembran mit Konformationsänderungen reagieren (Stühmer *et al.*, 1989). Man spricht daher von den Spannungssensoren der Na_v -Kanäle. Der Sensor von Domäne-4 ist dabei vor allem an der Kopplung von Aktivierung und Inaktivierung beteiligt (Chen *et al.*, 1996). Die schnelle Inaktivierung wird nach dem Ball-und-Ketten Modell durch die Bewegung eines hydrophoben Tripeptids (Isoleucin-Phenylalanin-Methionin, IFM-Motiv) auf der intrazellulären Seite in die Pore hinein vermittelt, wodurch der Ionenfluss blockiert wird (West *et al.*, 1992) (Abb. 1-2A, 1-3).

Abb. 1-3 zeigt eine Stromspur von $\text{Na}_v1.4$ -Kanälen der Ratte (r $\text{Na}_v1.4$), aufgenommen in der Ganzzell-Konfiguration der Spannungsklemme an einer transfizierten HEK293-Zelle, sowie das zugehörige Pulsprotokoll. Beim Haltepotential von -120 mV sind die Kanäle geschlossen (C, *closed*) und es fließt kein Strom. Bei Depolarisation der Membran auf 0 mV öffnen die Kanäle (O), resultierend in einem schnellen Na^+ -Einwärtsstrom. Innerhalb weniger Millisekunden nach Beginn der Depolarisation bewegt sich das IFM-Motiv und die Kanäle inaktivieren (I), so dass kein Strom mehr fließt (Abb. 1-3).

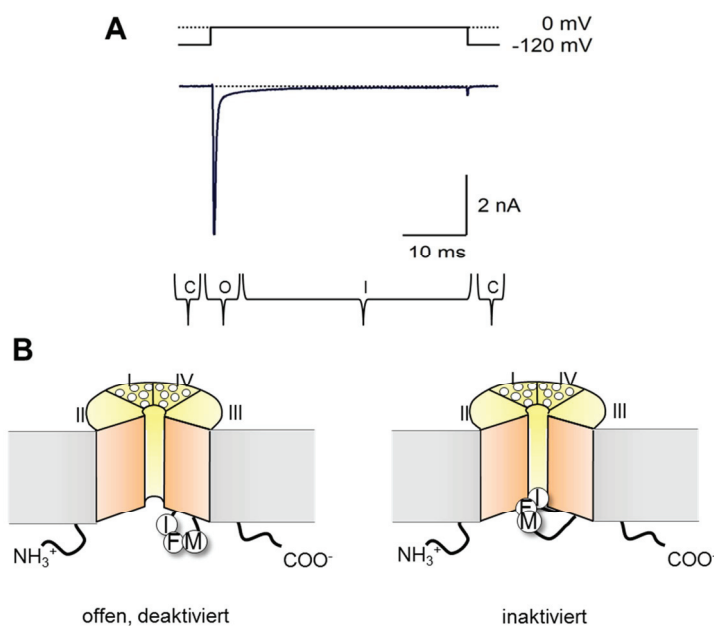


Abb. 1-3 A Stromspur von Na_v -Kanälen bei Depolarisation der Zellmembran auf 0 mV (Pulsprotokoll oben skizziert) mit Kennzeichnung der Zustände deaktiviert (closed, C), offen (open, O) und inaktiviert (I). **B** Schematische Darstellung des Mechanismus der schnellen Inaktivierung. Das Inaktivierungsmotiv IFM bindet nach dem Ball-und-Ketten Modell an einen porennahe Rezeptor auf zyttoplasmatischer Seite und verschließt die Pore (Catterall, 2000).

Die für Ionen durchlässige Pore wird von den Transmembransegmenten S5 und S6 und der diese Segmente verbindenden Schleife aller vier Domänen gebildet (Abb. 1-2). Eine besondere Rolle spielen vier Aminosäurereste, die ringförmig um die Kanalpore angeordnet sind. Diese Reste vermitteln die Ionenselektivität der Natriumkanäle (Heinemann *et al.*, 1992). Das sogenannte DEKA-Motiv, bestehend aus den Aminosäuren Asparaginsäure (D384 in $\text{rNa}_v1.2$), Glutaminsäure (E942 in $\text{rNa}_v1.2$), Lysin (K1421 in $\text{rNa}_v1.2$) und Alanin (A1714 in $\text{rNa}_v1.2$) mit einer Gesamtladung von -1, ermöglicht den Durchtritt eines Natriumions der Ladung +1 durch die Pore (Heinemann *et al.*, 1992; Schlieff *et al.*, 1996). Dabei spielen der Lysinrest und der Alaninrest eine besondere Rolle. Mutation des Lysinrestes beeinflusst die Na^+ -Selektivität negativ (Heinemann *et al.*, 1992; Schlieff *et al.*, 1996) und der Alaninrest vermittelt die Koordination des Na^+ -Ions über das Carbonylrückgrat (Lipkind & Fozzard, 2000; 2008). Bei Kalziumkanälen findet man hingegen ein EEEE-Motiv gebildet aus vier Glutamat-Resten mit der Nettoladung -4, wodurch je zwei Kalzium-Ionen bevorzugt die Pore durchqueren können (Schlieff *et al.*, 1996). Bei Kaliumkanälen wird die Selektivität allein über die Größe der K^+ -Ionen, nicht über deren Ladung erreicht. Die Ionen werden hier während der Porenpassage durch die Carbonylgerüste des Peptidrückgrates koordiniert (Lipkind *et al.*, 1995). Durch diese Motive wird die hohe Selektivität von Kaliumkanälen für Kalium gegenüber Natrium von 1000:1 erreicht (Hille, 2001). Na_v -Kanäle im Skelettmuskel haben eine Selektivität für Natrium gegenüber Kalium von etwa 12:1 (Hille, 2001). Natrium- und Kaliumkanäle sind hingegen nicht durchlässig für divalente Kationen und Anionen (Hille, 2001).

1.1.3 Kinetische Beschreibung der Schaltprozesse

Der zeitliche Verlauf von durch Na_V -Kanäle vermittelten Strömen kann mit einem Hodgkin-Huxley-Modell (Hodgkin & Huxley, 1952), unter Annahme von drei Aktivierungsschaltern (m^3) und einem Inaktivierungsschalter (h), beschrieben werden. Dabei ist I_{Na} der durch Na_V -Kanäle geleitete Ionenstrom, g_{Na} die Gesamtleitfähigkeit der Na_V -Kanäle, V das anliegende Membranpotential und E_{Na} das Natriumgleichgewichtspotential:

$$I_{\text{Na}} = m^3 \cdot h \cdot g_{\text{Na}} \cdot (V - E_{\text{Na}}) \quad (1)$$

Das von Hodgkin and Huxley (1952) entwickelte Modell nimmt acht mögliche Zustände eines Na_V -Kanals an, in denen die drei Aktivierungstore (m) und das Inaktivierungstor (h) aktiviert oder inaktiviert sind, wobei nur einer von diesen Zuständen den offenen Kanal beschreibt (m_3h_1). Dabei wird angenommen, dass alle Zustandsübergänge kinetisch identisch sind und die Tore unabhängig voneinander schalten (Hodgkin & Huxley, 1952). Das heißt, es erfolgt keine sequentielle Aktivierung der Tore und die Aktivierung eines Tores begünstigt die Aktivierung eines nächsten Tores nicht (Markov-Prozess) (Hodgkin & Huxley, 1952).

Da Na_V -Kanäle jedoch nicht vierfach symmetrisch aufgebaut sind und sich die Spannungssensoren der einzelnen Domänen voneinander unterscheiden, wurden Verfeinerungen und Veränderungen dieses Modelles (Aldrich *et al.*, 1983; Vandenberg & Bezanilla, 1991; Keynes, 1994) vorgenommen, die den Stromverlauf für Na_V -Kanäle besser beschreiben. Ein Beispiel ist das in Abb. 1-4 gezeigte Schaltmodell für Na_V -Kanäle in Tintenfischaxonen nach Vandenberg and Bezanilla (1991).

Das Hodgkin-Huxley-Modell (Hodgkin & Huxley, 1952) impliziert außerdem, dass die Spannungsabhängigkeit der maximalen Leitfähigkeit und der Aktivierung gleich sind, d.h. bei allen Spannungen sind bei Erreichen des Spitzenstromes ca. 50% der Kanäle offen. Auf eine schnelle Aktivierung folgt eine langsame Inaktivierung (Hille, 2001). Ein alternatives Modell nach Armstrong, Bezanilla, Aldrich, Corey und Stevens (ABACS-Modell) (Aldrich *et al.*, 1983) nimmt an, dass auf eine langsame Aktivierung eine spannungsunabhängige und schnelle mikroskopische Inaktivierung folgt. Die makroskopische Stromspur erlaubt keine Unterscheidung zwischen den beiden Mechanismen, da lediglich der Anteil der offenen Kanäle am Leitfähigkeitsmaximum verschieden ist (Aldrich *et al.*, 1983; Hille, 2001). Jedoch kann durch experimentelle Entfernung der schnellen Inaktivierung eine bei einigen Na_V -Kanälen vorhandene langsame Aktivierungskinetik sichtbar gemacht werden (Gonoi & Hille, 1987), welche bewirkt, dass die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der maximalen Leitfähigkeit bei überlagerter schneller Inaktivierung nicht identisch sind (Gonoi & Hille, 1987).

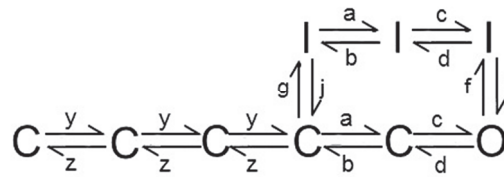


Abb. 1-4 Mögliches Schaltdiagramm von Na_V -Kanälen (nach Vandenberg & Bezanilla, 1991). Im gezeigten Modell gibt es fünf geschlossene Zustände, die sequentiell erreicht werden und schließlich zum offenen Zustand übergehen. Daneben existieren drei inaktivierte Zustände, die sowohl vom offenen Zustand aus, als auch von einem geschlossenen Zustand aus erreicht werden können. a, b, c, d, f, g, i, j, y und z sind die Reaktionszeitkonstanten der Übergänge.

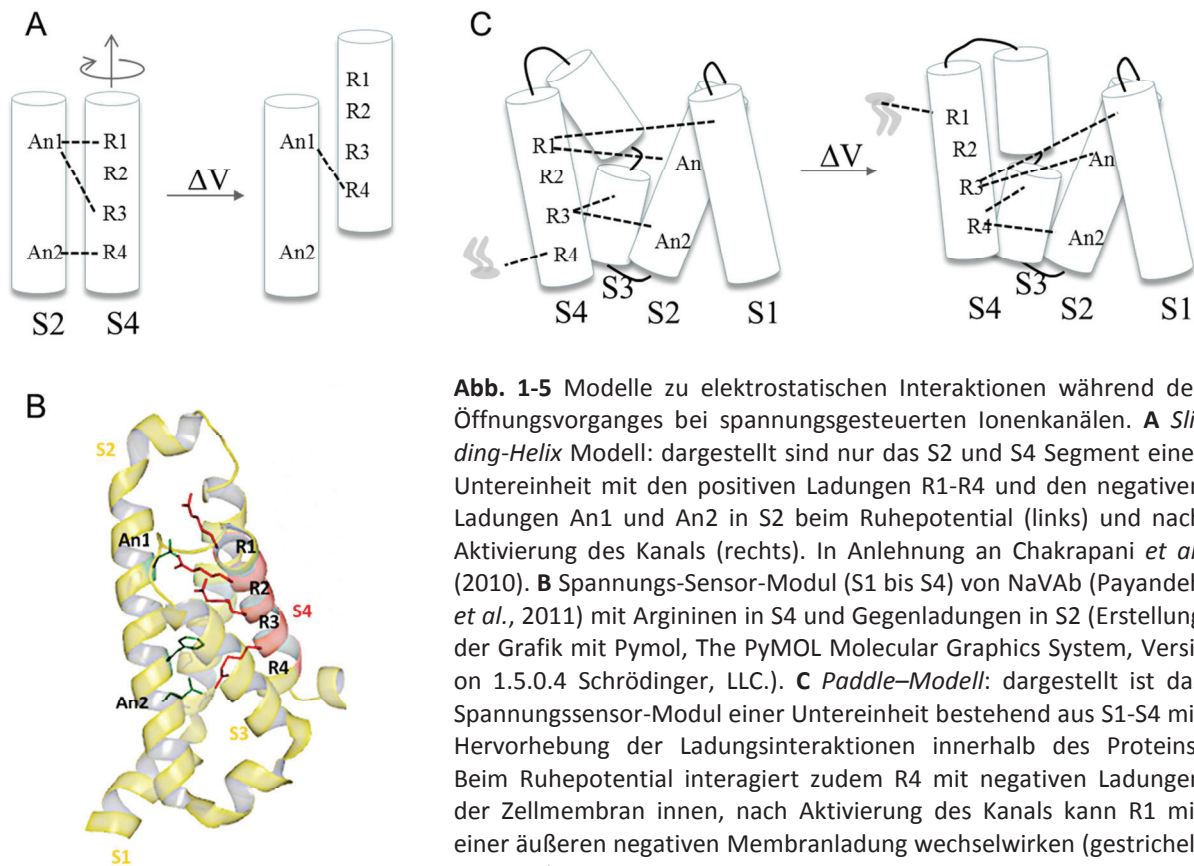
Chanda and Bezanilla (2002) nehmen zudem an, dass es mehr als einen offenen Zustand bei Na_V -Kanälen gibt, etwa dass der Kanal bereits bei Aktivierung der Sensoren in Domäne-1, 2 und 3 geöffnet ist, bevor S4 in Domäne-4 aktiviert.

Das Auffinden solcher Modelle erfolgt durch Anpassen von Modellen an Schaltströme und Einzelkanalströme, sowie durch experimentellen Einsatz von Neurotoxinen, die mit einzelnen Spannungssensoren wechselwirken, wie z. B. Anthopleurin-A (Hanck & Sheets, 1995; Groome *et al.*, 2011).

1.1.4 Der Öffnungsvorgang bei Na_V -Kanälen

Die Spannungssensor-Module der Na_V -Kanäle werden gebildet von den Transmembransegmenten S1-S4. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Teil der Kanalproteine eine funktional eigenständige Domäne darstellt (Lu *et al.*, 2002). Als Folge einer Änderung des elektrischen Feldes über der Zellmembran verändern die Spannungssensoren (S4 Segmente) ihre Position. Dadurch wird die Konformation des Porenbereiches so verändert, dass Ionen die Pore passieren können. Diese elektromechanische Kopplung des Aktivierungsvorgangs stellt man sich dabei folgendermaßen vor: Eine Auswärtsbewegung des Spannungssensors bewirkt einen Zug auf das S4-S5 Verbindungspeptid, wodurch das S6 Segment gedreht und die Pore geöffnet wird. Man geht heute davon aus, dass eine Auswärtsbewegung von 12-16 positiven Ladungen während des Öffnens von Natrium- und Kaliumkanälen erfolgt (Bezanilla, 2000; Kuzmenkin *et al.*, 2004). Dabei tragen die vier äußeren Arginine den Hauptanteil an den verschobenen Ladungen (Seoh *et al.*, 1996). Verringerung der Anzahl an positiven Ladungen in den S4 Segmenten durch Mutagenese in $\text{rNa}_V1.2$ führt zu einer Reduktion der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und zu einer Verschiebung auf der Spannungsachse (Stühmer *et al.*, 1989; Logothetis *et al.*, 1992).

Für die Bewegung der Spannungssensoren werden das *Helical-screw* Modell (Guy & Seetharamulu, 1986), das *Sliding-helix* Modell (Catterall, 1986; Catterall *et al.*, 1986) und das *Paddle* Modell (Tao & MacKinnon, 2008) diskutiert.



Die S2-Segmente aller spannungsgesteuerten Natriumkanäle besitzen zwei stark konservierte negative Ladungen (An1 und An2). Die S4-Segmente besitzen je 4-8 positive Ladungen, R1-R4(R8) (Abb. 1-5). Im Ruhezustand bildet R4 ein Ionenpaar mit An2 aus, um diesen Zustand zu stabilisieren, im aktivierten Zustand mit An1. Auf dem Weg vom Ruhe- in den aktivierten Zustand bilden alle positiven Ladungen sequentiell Ionenpaare mit den beiden negativen Gegenladungen aus (Abb. 1-5A) (Catterall, 2000). Außerdem können auch die Kopfgruppen der Membranphospholipide als Gegenladungen wirken (Long *et al.*, 2007). Die Mutation der äußeren positiven Ladungen zu kleineren nicht geladenen Resten wie Glutamin bewirkt die Entstehung kleiner Leckströme durch das Spannungssensormodul, sogenannte ω -Ströme. Im Ruhezustand sind ω -Ströme messbar bei der rNav1.2 Mutante R1QR2Q, im aktivierten Zustand bei R2QR3Q (Sokolov *et al.*, 2005), wodurch die Auswärtsbewegung des Spannungssensors während der Kanalaktivierung erkennbar ist. Das S4 Segment scheint dabei keine α -Helix beizubeh-

halten, sondern eine 3_{10} -Helix zu bilden, wodurch R3 und R4 weiter auseinander aber exakt auf der gleichen Seite der Helix positioniert sind (Long *et al.*, 2007). So kann die duale Interaktion von R3/An1 und R4/An2 ermöglicht werden (Long *et al.*, 2007). Die Enden von S4 (α -helikal) bewegen sich somit schraubenähnlich nach außen, während das zentrale Segment (3_{10} -helikal) sich scheinbar linear bewegt. Zwischen den beiden negativen Ladungen in S2 befindet sich in jedem Spannungssensor ein konserviertes Phenylalanin (Abb. 1-5B). Mutagenese-Studien zeigten, dass die rigide Struktur des Cyclohexan-Ringes in dieser Position essentiell für die Bewegung des S4 Segmentes ist (Tao *et al.*, 2010).

Das Paddel-Modell entwickelte man auf Grundlage der Kristallstruktur des bakteriellen Kaliumkanals KvAP (Jiang *et al.*, 2003). Die Struktur zeigte eine seitlich gekippte, an der Innenseite der Membran liegende S3-S4 Verbindung. Man nahm daher an, die C-terminale Hälfte von S3 (genannt S3b), S3-S4 Verbindung und S4 würden sich wie ein Paddel während des Aktivierungsprozesses nach außen schieben (Abb. 1-5C). Für das Paddel-Modell spricht, dass von außen applizierte Tarantulatoxine mit in der Membran liegenden Kanalbereichen interagieren können (Swartz, 2008; Tao & MacKinnon, 2008). Man vermutet heute, dass es sich bei der KvAP Struktur um einen nicht-nativen Zustand handelt, in welchem sich der Spannungssensor in der offenen, die Pore aber in der geschlossenen Position befindet (Lee *et al.*, 2005).

1.1.5 Funktionelle Modulierbarkeit von Nav-Kanälen

Das Schaltverhalten und die Leitfähigkeit von Nav-Kanälen können durch äußere und intrazelluläre Einflüsse moduliert werden. Das Gift mariner Kegelschnecken, Skorpione, Spinnen u. a. enthält eine Mischung sehr wirkungsvoller Toxine zur Jagd und zum Schutz gegen Fressfeinde. Viele dieser Giftmoleküle entfalten ihre Wirkung durch Beeinflussung der Funktionsweise spannungsabhängiger Natriumkanäle und bewirken Schmerzen, Lähmungen oder kardiale Arrhythmien bei den Opfern. Experimentell finden Neurotoxine Verwendung in der Aufklärung molekularer Funktionsweisen von Nav-Kanälen.

Die physiologische Regulation von Nav-Kanalfunktionen erfolgt durch Mechanismen wie alternatives Spleißen, Interaktionen mit intrazellulären Proteinen, und posttranslationale Modifikationen.

Im Folgenden werden die Mechanismen vorgestellt, die für diese Arbeit von Bedeutung sind.

1.1.5.1 Nav-Kanal-spezifische Neurotoxine

Die Klassifizierung der Neurotoxine erfolgt auf Basis ihrer Interaktionsstellen mit dem Nav-Kanalprotein, den *receptor sites* (RS). Abb. 1-6 gibt einen Überblick über die bekannten Toxin-Klassen, ihre Interaktionsstellen und Wirkung auf die Funktion des Kanals (Cestéle & Catterall, 2000).

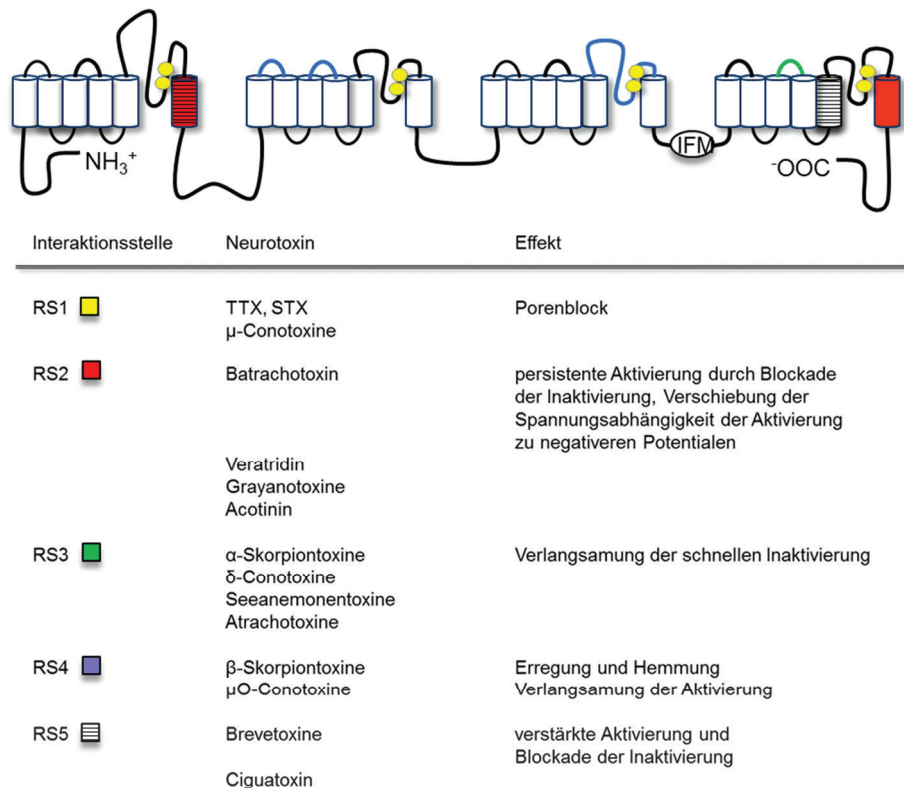


Abb. 1-6 Lokalisation der Kanal-Toxin-Interaktionsstellen (RS) im Kanalprotein und Wirkung der bekannten Neurotoxine auf die Funktion von Nav-Kanälen (Catterall, 2000; Cestéle & Catterall, 2000).

Eine besondere Bedeutung kommt dem niedermolekularen Kugelfischtoxin Tetrodotoxin (TTX) zu. TTX bindet in der Pore des Nav-Kanals und behindert den Na⁺-Strom (Terlau *et al.*, 1991). Die Sensitivität gegenüber TTX ist ein Klassifizierungsmerkmal für Nav-Kanäle. Man unterteilt in die gegenüber TTX resistenten Kanäle Nav1.8 und Nav1.9 (IC₅₀ > 10 μM), sowie Nav1.5 (IC₅₀ ~ 1 μM). Alle übrigen Nav-Kanäle sind stark empfindlich gegenüber TTX, mit IC₅₀-Werten im nM-Bereich (Catterall *et al.*, 2005).

Weitere Toxine, deren Effekt sich auch in einer Reduktion des Spitzenstromes äußert, sind μO-Conotoxine aus dem Gift einer marinen Kegelschnecken-Spezies (*Conus marmoreus*) und β-Skorpiontoxine z. B. aus dem Gift des Skorpions *Titius zerulatus*. Die Wirkmechanismen dieser Toxine unterliegen jedoch vollständig anderen Prinzipien. In beiden Fällen handelt es sich um

Peptidtoxine, die mit einem Bereich der Domäne-3 Porenschleife und mit dem Spannungssensor in Domäne-2 wechselwirken (Borges *et al.*, 2004; Leipold *et al.*, 2006; Zorn *et al.*, 2006; Leipold *et al.*, 2007; Leipold *et al.*, 2012). Abb. 1-7 zeigt den Effekt von μ O-MrVIA und β -Tz1 auf rNav1.4-Kanäle.

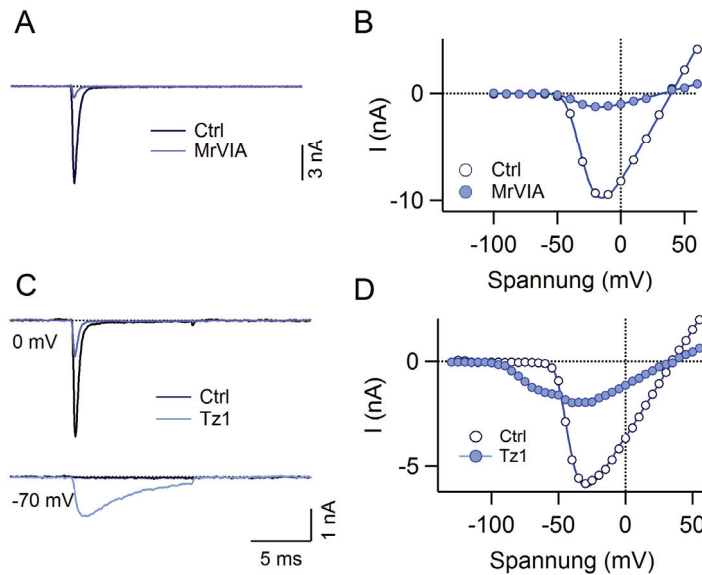


Abb. 1-7 A Wirkung der RS4-Toxine μ O-MrVIA und β -Tz1 auf rNav1.4 exprimiert in Neuro-2A-Zellen. A Stromantworten bei 0 mV vor (schwarz) und nach (blau) Applikation von 400 nM MrVIA. Der maximale Spitzenstrom von rNav1.4 wird um ~75% reduziert. B Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wird durch MrVIA nicht verändert. C Stromantworten bei 0 mV und -70 mV vor (schwarz) und nach Applikation von 5 μ M Tz1 (blau). D Tz1 bewirkt eine Linksverschiebung der Aktivierungsschwelle der Na_v-Kanäle und eine Reduktion des Maximalstromes.

Beispiele für Toxine die der RS3 zugeordnet werden sind α -Skorpiontoxine, wie Lqh2 aus dem Skorpion *Leiurus quinquestriatus*, und δ -Conotoxine, wie SVIE aus der marinen Kegelschnecke *Conus striatus*. Diese Peptidtoxine interagieren mit der extrazellulären Schleife zwischen S3 und S4 in Domäne-4 der Na_v-Kanäle und bewirken so eine Verlangsamung der Inaktivierung (Leipold *et al.*, 2004; Leipold *et al.*, 2005). In Abb. 1-8 ist die Wirkung von α -Lqh2 und δ -SVIE auf rNav1.4 gezeigt.

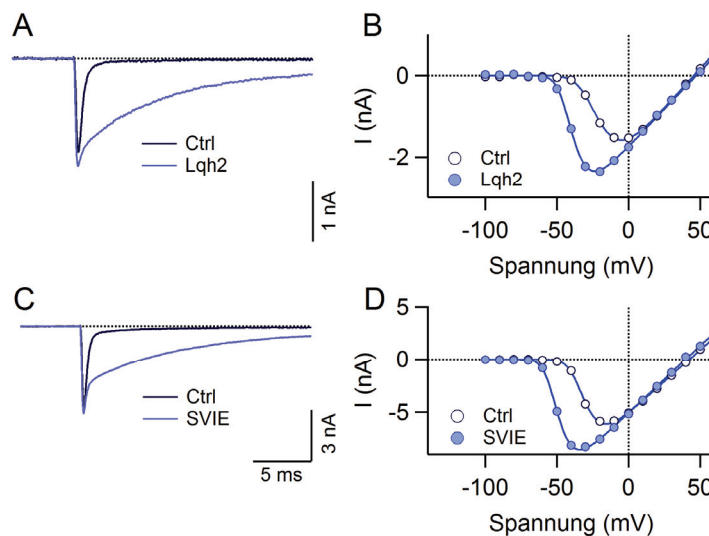


Abb. 1-8 Wirkung der RS3-Toxine α -Lqh2 und δ -SVIE auf rNav1.4 exprimiert in Neuro-2A-Zellen. A Stromantworten bei 0 mV vor (schwarz) und nach (blau) Applikation von 20 nM Lqh2. B Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wird durch Lqh2 zu negativeren Spannungen verschoben. C Stromantworten bei 0 mV vor (schwarz) und nach Applikation von 2 μ M SVIE (blau). D Auch durch SVIE wird die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu negativeren Spannungen verschoben.

1.1.5.2 Oxidationssensitivität von Na_v-Kanälen

Unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*, ROS) werden Sauerstoffhaltige Moleküle zusammengefasst, die aufgrund ungepaarter Elektronen chemisch hoch reaktiv sind. Dazu zählen unter anderem Singulett-Sauerstoff (¹O₂), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Superoxid (O₂•) und Hydroxylradikale (•OH) (Weissbach *et al.*, 2002). Reaktive Sauerstoffspezies entstehen im Rahmen normaler Stoffwechselprozesse (Hoshi & Heinemann, 2001; Weissbach *et al.*, 2002), und in erhöhtem Maße unter pathophysiologischen Bedingungen. In der Zelle sollte daher ein Gleichgewicht zwischen ROS-bildenden Prozessen (z.B. unvollständige Oxidation von Sauerstoff in der mitochondrialen Atmungskette (Wolin *et al.*, 2005), Bildung in Peroxisomen (Hool, 2006) von Phagozyten im Rahmen der *host defence*) und ROS-abbauenden Vorgängen (Glutathion, Methioninsulfoxidreduktasen (Hansel *et al.*, 2005), Thio-redoxin) aufrechterhalten werden. Entstehen hingegen ROS im Übermaß, kann zum Beispiel ein Einfluss auf die Bildung von Aktionspotentialen beobachtet werden. Beispielsweise werden A-Typ K⁺-Kanäle wie Kv1.4 direkt durch ROS moduliert: Nach Applikation von Chloramin-T (ChT) verschwindet ihre Inaktivierung, wodurch die Feuerfrequenz von DRG-Neuronen beeinflusst wird (Hsieh, 2008) und damit die Entstehung von inflammatorischem und neuropathischem Schmerz begünstigt werden kann.

Das experimentell zur Untersuchung von ROS-Effekten eingesetzte ChT modifiziert die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin (Met) und Cystein (Cys) in Proteinen (Shechter *et al.*, 1975). Kommen Na_v-Kanäle in Kontakt mit ChT, verlangsamt sich ihre Inaktivierung (Ulbricht, 2005), während die Aktivierung nicht beeinflusst wird (Wang, 1984b; a). Die Ursache für die Oxidationssensitivität der Inaktivierung von Na_v-Kanälen ist das Methionin im Inaktivierungspartikel IFM (Kassmann *et al.*, 2008). Dieses vermittelt die Inaktivierung durch Ausbildung einer hydrophoben Interaktion (Rohl *et al.*, 1999) mit einem porennahen Rezeptorbereich auf der intrazellulären Seite des Kanalproteins. Wird dieses Methionin zum weniger hydrophoben Methioninsulfoxid (MetO) (Black & Mould, 1991) oxidiert, ist die hydrophobe Interaktion mit dem IFM-Rezeptor gestört (Hoshi & Heinemann, 2001) und die Kanalinaktivierung behindert. Für verschiedene Vertreter der Familie der Na_v-Kanäle wurde der Inaktivierungsverlust in Folge ChT-Einwirkung bereits beschrieben (Kassmann *et al.*, 2008). Einen Sonderfall stellt Na_v1.5 dar, da dieser als einziger Na_v-Kanal ein Cystein in der Pore in Domäne-1 besitzt (C373). Wird dieses Cystein oxidiert, resultiert eine Reduktion des Ionenstromes durch den Kanal (Barrington *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 2005; Kassmann *et al.*, 2008), die als zusätzlicher Effekt neben dem Inaktivierungsverlust beobachtet werden kann.

Durch das Zusammenspiel und die Abfolge von Reduktion des Spitzenstromes und dem Verlust der schnellen Inaktivierung, ergibt sich ein großer Regulationsspielraum für Nav-Kanal gekoppelte Zellfunktionen.

Weitere Beispiele für den Einfluss übermäßiger ROS-Produktion auf elektrische Eigenschaften von Zellen sind das durch die NADPH-Oxidase gebildete Superoxid, welches indirekt TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*) Kanäle in DRG-Neuronen aktivieren und so die Sensibilität von Mäusen gegenüber schmerzhaften Stimuli erhöhen kann (Ma *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu verringern ROS abfangende Moleküle wie das Superoxid-Dismutase (SOD)–Mimetikum Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) den Natriumstrom in kleinen und mittleren DRG-Neuronen der Ratte, was sich in der Verminderung einer bestimmten Reflexreaktion (*exercise pressor reflex*) äußert (Wang *et al.*, 2011).

1.2 Der spannungsabhängige Natriumkanal Nav1.8

1.2.1 Physiologische Bedeutung im peripheren Nervensystem

Nav1.8 (auch SNS – *sensory neuron specific* oder PN3 – *peripheral nerve 3*) ist kodiert durch das Gen *SCN10A*, welches sich auf Chromosom 3 des Menschen in der Nähe des *SCN5A* (Nav1.5) und des *SCN11A* (Nav1.9) Locus befindet. Der TTX-resistente Kanal Nav1.8 wird hauptsächlich in afferenten Neuronen der Hinterwurzelganglien (*dorsal root ganglia*, DRG) exprimiert (Renganathan *et al.*, 2000; Renganathan *et al.*, 2001) und ist der vorherrschende Natriumkanaltyp in A δ - und nicht myelinisierten C-Fasern (Amir *et al.* 2006, Rush *et al.* 2007). DRG-Neuronen leiten elektrische Signale von den feinen Nervenendigungen in der Peripherie zum Dorsalhorn des Rückenmarks. Verletzungen in der Umgebung freier Nervenendungen in der Peripherie führen zu Entzündungsreaktionen verbunden mit der Freisetzung von Histamin, Prostaglandinen und Neuropeptiden. Diese wirken auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wodurch es letztlich zur Freisetzung von cAMP und der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) kommt. Die Phosphorylierung von Nav1.8 durch PKA bewirkt eine Links-Verschiebung der Aktivierung auf der Spannungsachse (Fitzgerald *et al.*, 1999), in Folge derer die Schwelle der Nozizeptoren sinkt (Hyperalgesie) (Kerr *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010). Nav1.8 ist somit an der Entstehung inflammatorischer und chronischer Schmerzen beteiligt. Daher bereitet die Aufklärung von Funktions- und Regulationsmechanismen von Nav1.8 auch die Basis für die Entwicklung von Schmerzmitteln unter Betrachtung dieses Nav-Kanals als Zielmolekül (z. B. Cummins *et al.* (2007)).

1.2.2 Physiologische Bedeutung von Nav1.8 im Herzen

Neben seiner seit längerem bekannten Funktion in DRG-Neuronen, scheint Nav1.8 auch im Herzen exprimiert zu werden. Es wurden intrakardiale sensorische Nervenfasern mit Nav1.8 Immunreaktivität beim Menschen nachgewiesen (Facer *et al.*, 2011) und funktionelle Nav1.8 Kanäle in intrakardialen Neuronen (Verkerk *et al.*, 2012). Ein bekannter SNP (*single nucleotide polymorphism*) bei Nav1.8, welcher sich in der Variabilität der Aminosäure V1073A äußert, wurde mit einem verlängerten PR-Intervall im EKG und einem höheren Risiko für Herzversagen in Verbindung gebracht (Chambers *et al.*, 2010). Zudem zeigen *SCN10A*^{-/-} Mäuse kürzere PR-Intervalle als *SCN10A*^{+/+} Mäuse (Chambers *et al.*, 2010).

1.2.3 Nav1.8-assoziierte Phänotypen der Maus

SCN10A^{-/-} Mäuse zeigen Veränderungen in der Reaktion auf Schmerzreize. Sie reagieren normal auf thermische Reize, allerdings weniger auf mechanische Stimuli als Wildtyp-Mäuse (Matthews *et al.*, 2006). *SCN10A*^{-/-} Mäuse reagieren kaum auf noxische Kälte und mechanische Reize während Kühlung der Haut, was auf die im Gegensatz zu TTX-sensitiven Nav-Kanälen nahezu temperaturunabhängige langsame Inaktivierung von Nav1.8 zurückgeführt werden kann (Zimmermann *et al.*, 2007). Wie zuvor beschrieben, zeigen die *SCN10A*^{-/-} Mäuse außerdem Veränderungen im EKG (Chambers *et al.*, 2010).

Blasius *et al.* (2011) beschrieben einen weiteren Nav1.8-assoziierten Phänotyp bei Mäusen. Diese Nav1.8^{Possum} Mäuse tragen die hypermorphe Mutation T790A. Die Mutation befindet sich am intrazellulären Ende des S5 Segmentes von Domäne-2 von Nav1.8 und bewirkt einen Stimulus-abhängigen Verhaltensphänotyp der Maus. Auf ein Zusammenknäulen der Haut im Genick der Mäuse reagieren diese mit einer tonischen Immobilität des ganzen Körpers, daher die Bezeichnung Possum (Blasius *et al.*, 2011). Die Mutation T790A befindet sich in orthologer Position zu T704M in Nav1.4, welche an der Entstehung von hyperkaliämischer periodischer Paralyse (*hyperkaleamic periodic paralysis*, HyperPP) (Ptacek *et al.*, 1991; Bendahhou *et al.*, 1999) und *Paramyotonia Congenita* beteiligt ist (Kim *et al.*, 2001; Han & Kim, 2011). Zudem zeigen Nav1.8^{Possum} Mäuse eine um 50% reduzierte Herzfrequenz und Abnormitäten im Herzrhythmus nach Induktion des Phänotyps, sowie eine erhöhte Sensitivität für kälteinduzierten Schmerz (Blasius *et al.*, 2011).

1.2.4 Besonderheiten im Schaltverhalten von Nav1.8

Die wohl auffälligste Eigenschaft von Nav1.8 ist, dass die Aktivierung dieses Kanals eine deutlich stärkere Membrandepolarisation erfordert, als dies bei anderen Nav-Kanälen wie etwa dem

Skelettmuskelkanal Nav1.4 und TTX-sensitiven Nav-Kanälen in DRG-Neuronen zu beobachten ist (z. B. Elliott & Elliott, 1993; Browne *et al.*, 2009; Leipold *et al.*, 2011; Knapp *et al.*, 2012). Die molekulare Ursache dieses Verhaltens ist bislang nicht bekannt, funktionell ist es möglicherweise bedeutend um ein spontanes Feuern der schmerzleitenden Neuronen bei unterschwelligen Reizen zu verhindern.

Des Weiteren ist die Inaktivierungskinetik von Nav1.8 sehr langsam verglichen mit dem TTX-sensitiven Strom in DRG-Neuronen (Elliott & Elliott, 1993). Die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung erfolgt der Literatur nach bei Nav1.8 schneller als bei anderen Nav-Kanälen (Elliott & Elliott, 1993; Dib-Hajj *et al.*, 1997), wodurch die Refraktärphase der Neurone nach AP-Auslösung verkürzt werden kann und eine höhere Aktionspotential-Frequenz möglich ist (Patrick Harty & Waxman, 2007).

Zudem wird der Eintritt in die langsame Inaktivierung bei Nav1.8 mit sinkenden Temperaturen nicht schneller eingeleitet wie z.B. bei Nav1.7 (Zimmermann *et al.*, 2007). Somit ermöglicht Nav1.8 das Schmerzempfinden bei niedrigen Temperaturen und vermittelt auch den durch niedrige Temperaturen verursachten Schmerz (Zimmermann *et al.*, 2007).

1.2.5 Molekulare Pharmakologie von Nav1.8

Nav1.8 ist neben Nav1.9 für die Ausbildung des TTX-resistenten Stromes in DRG-Neuronen verantwortlich (Renganathan *et al.*, 2000). Die Resistenz gegen TTX ist auf einen einzelnen Aminosäurerest in der Porenschleife von Domäne-1 zurückzuführen. Das Serin in der Position 356 bei rNav1.8 bewirkt, dass der Kanal bei Messungen an *Xenopus laevis* Oozyten von TTX mit einem IC₅₀ von 60 µM geblockt wird (Sivilotti *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu liegt der IC₅₀ der TTX-sensitiven Nav-Kanäle im nM Bereich (Catterall *et al.*, 2005). Die Mutation S356F (Austausch des Serin gegen Phenylalanin wie man es in Nav1.2 findet) setzt den IC₅₀ von TTX auf 3 nM herab (Sivilotti *et al.*, 1997). Ebenso bewirkt S356 auch die Resistenz gegen ein weiteres RS1-Toxin, das Saxitoxin (STX). Der IC₅₀ von STX bei Nav1.8 beträgt 760 nM, bei rNav1.8-S356F ist die Sensitivität deutlich höher, mit einem IC₅₀ von nur 8 nM (Sivilotti *et al.*, 1997).

Hinsichtlich RS3 ist die Unempfindlichkeit von Nav1.8 gegen α-Lqh-Toxine aus dem Gift des Skorpions *Leiurus quinquestriatus* bekannt (Saab *et al.*, 2002). Als molekulare Ursache dafür wird eine bestimmte Tetrapeptid-Sequenz im S3S4-Bereich von Domäne-4 vermutet, welche spezifisch für Nav1.8 ist. Das Einbringen dieser Sequenz in Nav1.4 lässt den Kanal unempfindlich gegen das Skorpion-Gift werden (Saab *et al.*, 2002). Betreffend δ-Conotoxinen existieren bislang keine Daten zu Nav1.8.

Ekberg *et al.* (2006) zeigten, dass das μ O-Conotoxin MrVIB aus der marinen Kegelschnecke *Conus marmoreus* in der Lage ist, Nav1.8, nicht aber TTX-sensitive Ströme, in sub- μ M Konzentrationen zu inhibieren. Humaner Nav1.8, exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, wird mit 10-fach höherer Effizienz blockiert als Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5 und Nav1.7 (Ekberg *et al.*, 2006). Die Spezifität für Nav1.8 gegenüber Nav1.2 wird durch Domäne-2 beeinflusst, wie neuere Untersuchungen mit MrVIB an Nav1.2/Nav1.8 Chimären in *Xenopus laevis* Oozyten zeigten (Knapp *et al.*, 2012). Zudem ist der Effekt von μ O-MrVIB auf Nav1.8 modulierbar durch die Ko-Expression verschiedener Nav β -Untereinheiten (Wilson *et al.*, 2011). Zur Sensitivität von Nav1.8 gegenüber den ebenfalls an RS4 wirkenden Skorpion- β -Toxinen ist bislang nichts bekannt.

Neben den oben aufgelisteten Toxinen ist die Wirkung verschiedener Lokalanästhetika auf Nav1.8 beschrieben worden. Lokalanästhetika wirken über Interaktion mit einem Phenylalaninrest am C-terminalen Ende von S6 in Domäne-4 (Strichartz, 1976) und bewirken einen Block in Abhängigkeit des Schaltzustandes, in dem sich die Kanäle befinden (*use-dependence*). Beispielsweise bewirkt Tetracain einen tonischen Block von Nav1.8 mit einem IC_{50} um 12 μ M (John *et al.*, 2004), Mexiletin und Lidocain mit einem $IC_{50} < 4 \mu$ M (Dekker *et al.*, 2005).

A-803467 ist ein neuer Natriumkanalblocker, der sehr spezifisch TTX-resistente Ströme ($IC_{50} = 140$ nM) blockiert und die Bildung von AP's in DRG-Neuronen verhindert. A-803467 blockiert humanen Nav1.8 ($IC_{50} = 8$ nM) mit >100-fach höherer Effizienz als humanen Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5 und Nav1.7 ($IC_{50} \geq 1 \mu$ M) (Jarvis *et al.*, 2007).

1.2.6 Modulation von Nav1.8 durch intrazelluläre Mechanismen

1.2.6.1 N- und C-Termini als Regulatoren der Expressionsstärke

Es sind einige Studien zum elektrophysiologischen Verhalten von rekombinantem Nav1.8 nach Expression in verschiedenen Zelllinien publiziert. Nav1.8 lässt sich in neuronalen Zelllinien wie ND7/23 (John *et al.*, 2004; Browne *et al.*, 2009) und SH-SY5Y (Dekker *et al.*, 2005) funktionell exprimieren, ebenso in *Xenopus laevis* Oozyten (z. B. Vijayaragavan *et al.*, 2004b; Vijayaragavan *et al.*, 2004c). In nicht-neuronalen Zelllinien ist die heterologe Expression von Nav1.8 vermutlich aufgrund von verminderter Membranintegration des Proteins kaum möglich (Zhao *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010).

Offensichtlich ist der C-Terminus des Nav1.8-Kanalproteins maßgeblich an der Regulation der Expressionsstärke und der Membranintegration beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch des Nav1.8 C-Terminus gegen den von Nav1.4 die Expression in ND7/23-Zellen erhöht, umgekehrt soll der Nav1.8-C-Terminus die Expression von Nav1.4 hemmen (Choi *et al.*, 2004). Dieser Effekt wurde auf eine Interaktion mit Calmodulin zurückgeführt (Choi *et al.*,

2006). Einen analogen Ansatz verfolgt eine andere Arbeit, bei der entsprechende Chimären aus Nav1.7 und Nav1.8 in der nicht-neuronalen Zelllinie tsA201 exprimiert wurden. Hier konnte weiterführend gezeigt werden, dass allein der konservierte proximale Teil des C-Terminus für die Expressionsstärke ausschlaggebend ist, nicht aber der wenig konservierte distale Abschnitt (Vijayaragavan *et al.*, 2004a).

Auch der N-Terminus von Nav1.8 scheint einen Einfluss auf die Expression und den Membrantransport zu nehmen. Die leichte Kette von Annexin-II, p11, bindet an den N-Terminus von Nav1.8, wodurch sich die Dichte der Kanalproteine in der Zellmembran erhöht (Okuse *et al.*, 2002; Poon *et al.*, 2004).

1.2.6.2 Interaktion mit intrazellulären Proteinen

Einige Proteine die mit intrazellulären Bereichen von Nav1.8 interagieren und so Einfluss auf das Verhalten des Kanals nehmen sind bekannt. Eine Liste potentieller Interaktionspartner wurde immunologisch bestimmt, jedoch ohne funktionelle Untersuchungen (Malik-Hall *et al.*, 2003). Neben den bereits erwähnten, die Expression beeinflussenden Interaktionen mit p11 (Okuse *et al.*, 2002; Poon *et al.*, 2004; Donier *et al.*, 2005; Foulkes *et al.*, 2006) und CaM (Deschênes, 2002; Choi *et al.*, 2006) wird das Schaltverhalten von Nav1.8 durch Nav β -Untereinheiten moduliert. Besonders die Inaktivierungskinetik ist abhängig davon, welche β -Untereinheit im jeweiligen Expressionssystem dominiert (Morgan *et al.*, 2000; Vijayaragavan *et al.*, 2004c). Neuere Arbeiten zeigten auch, dass β_3 in der Lage ist, ein ER-Retentionssignal (RRR) von rNav1.8 im D1-D2 Verbindungspeptid zu maskieren und so ebenfalls die Membranintegration von Nav1.8 zu verstärken (Zhang *et al.*, 2008). Für eine physiologische Erklärung spricht die Beobachtung, dass die Expression von β_3 zusammen mit Nav1.8 in Maus-Modellen für neuropathischen Schmerz hochreguliert wird (Shah *et al.*, 2000). An der Regulation des Nav1.8-Stromes sind auch Phosphorylierungen durch Proteinkinase-A (Fitzgerald *et al.*, 1999) und p38-MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (Hudmon *et al.*, 2008) beteiligt.

1.2.6.3 Alternatives Spleißen

Durch alternatives Spleißen entstehen Isoformen von Kanalproteinen, die die Funktionsweise der Kanäle und damit der exprimierenden Zellen teils erheblich beeinflussen können. Beispielsweise kennt man für den vor allem im Herzmuskel gebildeten Kanal Nav1.5 einige Spleiß-Varianten, die auch klinisch bedeutsam sind (siehe Review von Schroeter *et al.*, 2010). Bislang ist zur Regulation von Nav1.8 durch alternatives Spleißen jedoch wenig bekannt. Kerr *et al.* (2004) beschrieben für Nav1.8 der Ratte und der Maus eine Spleißvariante (Insertion/ Deletion

eines Glutamin-Restes in der Domäne-2/3 Schleife). Es erfolgte bislang keine elektrophysiologische Analyse der aus diesem Spleißereignis resultierenden Nav1.8 Isoform.

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Nav1.8 ist der vorherrschende Nav-Kanal in schmerzvermittelnden Hinterwurzelganglien und hat somit einen großen Anteil an der Ausbildung der elektrischen Eigenschaften dieser Zellen. Verglichen mit anderen Vertretern der Nav-Familie sind Nav1.8-Kanäle kaum detailliert funktionell charakterisiert wurden.

Ziel dieser Arbeit war es – neben der elektrophysiologischen Charakterisierung von Nav1.8-Kanälen nach heterologer Expression in neuronalen Zelllinien – zunächst mit Hilfe einer Domänen austausch-Strategie die Besonderheiten im Schaltverhalten von Nav1.8 einzelnen Molekülbereichen zuzuordnen und die besonderen, dem Schalten dieses Kanals zu Grunde liegenden, Mechanismen besser erklären zu können. Ergänzend dazu sollten Neurotoxine, welche Schaltübergänge von Nav-Kanälen beeinflussen können und deren Wirkmechanismus bekannt ist, eingesetzt werden. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Regulation des Kanals Nav1.8 durch intrazelluläre Mechanismen zu untersuchen und zu beschreiben.

2 Material und Methoden

Um ein tieferes Verständnis der molekularen Funktionsweise und der Regulation von Nav1.8 zu erzielen, wurden molekularbiologisch Chimären verschiedener Kanalbereiche aus rNav1.4 und rNav1.8 bzw. hNav1.8 erzeugt. Die elektrophysiologische Untersuchung aller Konstrukte erfolgte mit Hilfe der Ganzzell-Konfiguration der Spannungsklemme nach Expression der Kanäle in neuronalen (Neuro-2A, ND7/23) und nicht-neuronalen Zelllinien (HEK293, tsA201). Auf Basis der elektrophysiologischen Daten konnten gezielte Punktmutationen erzeugt werden, um Funktionsmodelle weiter zu prüfen.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Expressionsplasmide, Kanalkonstrukte und Mutanten

Zu Beginn der Arbeit lagen die in Tabelle 1 aufgelisteten Expressionskonstrukte der Wildtyp Nav-Kanäle vor. Die dabei verwendeten Expressionsvektoren für Säugerzellen waren pcDNA3 für rNav1.8 und rNav1.4, pCMV6-XL5 für hNav1.8 und pRcCMV für hNav1.4.

Tabelle 1 In der Arbeit verwendete Ausgangsplasmide und Wildtypen der Natriumkanäle.

Gen (Spezies)	Expressionsplasmid	Sequenz (UniProt) und Referenz
SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	rNav1.8_pcDNA3	Q62968 (Akopian <i>et al.</i> , 1996)
SCN10A (<i>Homo sapiens</i>)	hNav1.8_pCMV6-XL5	Q9Y5Y9.2 (OriGene Technologies Inc., Rockville, Maryland, USA)
SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	rNav1.4_pcDNA3	P15390 (Trimmer <i>et al.</i> , 1989)
SCN4A (<i>Homo sapiens</i>)	hNav1.4_pRcCMV	P35499

Außerdem existierten folgende Chimären und Punktmutationen dieser Kanäle (Tabelle 2). Die Nomenklatur 44(p7)4 zeigt beispielsweise an, dass in rNav1.4 die Porenschleife der Domäne-3 gegen die orthologe Sequenz von hNav1.7 ersetzt wurde. In 4844, 4484 und 4448 stammt die zweite, dritte bzw. vierte Domäne aus Nav1.8, der Rest der Sequenz des Kanals aus Nav1.4. 8888c4 ist eine Chimäre von Nav1.8, bei der die C-terminalen Aminosäuren (1736 – 1956) gegen die entsprechenden Reste von Nav1.4 ausgetauscht wurden.

Tabelle 2 Zu Beginn der Arbeit vorliegende, von den Wildtypen abweichende Expressionskonstrukte.

Gen	Expressionsplasmid	Referenz
SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	rNav1.4_YS_pcDNA3	Leipold <i>et al.</i> (2011)
SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	rNav1.4_IFC_pcDNA3	Markgraf <i>et al.</i> (2012)
SCN4A/SCN5A (<i>Rattus norvegicus</i> / <i>Homo sapiens</i>)	44(p5)4_pcDNA3	Leipold <i>et al.</i> (2006)
SCN4A/SCN8A (<i>Rattus norvegicus</i> / <i>Mus musculus</i>)	44(p6)4_pcDNA3	Leipold <i>et al.</i> (2006)
SCN4A/SCN9A (<i>Rattus norvegicus</i> / <i>Homo sapiens</i>)	44(p7)4_pcDNA3	Leipold <i>et al.</i> (2006)
SCN4A/SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4844_pcDNA3	Schirmeyer (2007)
SCN4A/SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4484_pcDNA3	Schirmeyer (2007)
SCN4A/SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4448_pcDNA3	Schirmeyer (2007)
SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	r8888c4_pcDNA3	Schirmeyer (2007)
SCN10A/SCN4A (<i>Homo sapiens</i> / <i>Rattus norvegicus</i>)	h8888c4_pCMV6-XL5	Schirmeyer (2007)

Tabelle 3 enthält alle im Rahmen dieser Dissertation neu angefertigten Konstrukte und Mutanten. Aufgrund der Notwendigkeit der Verwendung neuronaler Zellen wurden alle Kanäle deren Domäne-1 aus Nav1.4 stammt, einmal in der TTX-sensitiven Form (Y401) und in der TTX-resistenten Form (Y401S) erzeugt. IFC und IFL bezeichnen Mutationen des Inaktivierungsmotivs IFM in der Domäne-3/4 Schleife.

Tabelle 3 Im Rahmen dieser Arbeit angefertigte Mutanten und Chimären. rNav1.4-Mutanten sowie alle Chimären, deren Domäne-1 von rNav1.4 stammt, enthalten die Mutation Y401S, um Resistenz gegen TTX zu erzielen. Als Expressionsvektor für Säugerzellen diente pcDNA3, mit Ausnahme aller hNav1.8-Mutanten (pCMV6-XL5). Abk.: AS – Aminosäure-Rest, nt – Nukleotide

Name des Kanals	Gen (Spezies)	Beschreibung
8844	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Austausch der nt 1-3120 (AS 1 – 1040) von rNav1.4 gegen das entsprechende Fragment von rNav1.8
4488	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Austausch der nt 3121-5520 (AS 1041 – 1840) von rNav1.4 gegen das entsprechende Fragment von rNav1.8
8444	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Austausch der nt 1-1328 (AS 1 – 443) von rNav1.4 gegen das entsprechende Fragment von rNav1.8
4844	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Austausch der nt 1329-3120 (AS 444 – 1040) von rNav1.4 gegen das entsprechende Fragment von rNav1.8
4484	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Austausch der nt 3121-3863 (AS 1041 – 1288) von rNav1.4 gegen das entsprechende Fragment von rNav1.8
4448	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Austausch der nt 3864-5520 (AS 1289 – 1840) von rNav1.4 gegen das entsprechende Fragment von rNav1.8
8844_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	8844 + M1435C
4488_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4488 + M1307C
8444_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	8444 + M1260C

4844_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4844 + M1480C
4484_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4484 + M1307C
4448_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4448 + M1305C
4448+V	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4448, Insertion V1438 (S3S4 in Domäne-4)
4448-EN	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4448, Deletion von E1434 und N1435 (S3S4 in Domäne-4)
rNav1.8_IFC	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	M1436C
hNav1.8_IFC	SCN10A (<i>Homo sapiens</i>)	M1435C
rNav1.8_IFL	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	M1436L
rNav1.8_M1653I	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	M1653I
rNav1.8-EGFP	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	bildet C-terminales Fusionsprotein von rNav1.8 mit EGFP
hNav1.8-EGFP	SCN10A (<i>Homo sapiens</i>)	bildet C-terminales Fusionsprotein von hNav1.8 mit EGFP
hNav1.8-Q1030	SCN10A (<i>Homo sapiens</i>)	Deletion von Q1030 in der Domäne-2/3 Schleife
hNav1.8-e11	SCN10A (<i>Homo sapiens</i>)	Deletion von Exon11 (294 nt), entsprechend Serin 488-Serin 585 in der Domäne-1/2 Schleife
hNav1.8-e11-EGFP	SCN10A (<i>Homo sapiens</i>)	Deletion von Exon11 (294 nt), Fusion mit EGFP
44(p8)4	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Porenschleife Domäne-3: R1250G, K1252I, E1253N, E1254S, H1257N, Y1258W, V1260N
rNav1.8_QG	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	KK726QG (S3S4 in Domäne-2)
rNav1.8_S	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	C733S (S3S4 in Domäne-2)
rNav1.8_NV	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	KK747NV (S3S4 in Domäne-2)
rNav1.8_QGNV	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	KK726QG, KK747NV (S3S4 in Domäne-2)
rNav1.8_QG_IFC	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	KK726QG, M1436C
rNav1.8_NV_IFC	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	KK747NV, M1436C
rNav1.8_QGNV_IFC	SCN10A (<i>Rattus norvegicus</i>)	KK726QG, KK747NV, M1436C
4844_QG	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4844 + KK772QG
4844_S	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4844 + C779S
4844_NV	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4844 + KK793NV
4844_QG_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4844_QG + M1480C
4844_S_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4844_S + M1480C
4844_NV_IFC	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	4844_NV + M1480C
rNav1.4_YS_IFC	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Y401S, M1305C

rNav1.4_KK2	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	NV634KK (S3S4 in Domäne-2)
rNav1.4_KKC	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	QG634KK, S641C (S3S4 in Domäne-2)
rNav1.4_KKCKK	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	QG634KK, S641C, NV655KK (S3S4 in Domäne-2)
rNav1.4_C	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	S641C (S3S4 in Domäne-2)
rNav1.4_KK2_IFC	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	NV655KK, M1305C
rNav1.4_KKC_IFC	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	QG634KK, S641C, M1305C
rNav1.4_KKCKK_IFC	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	QG634KK, S641C, NV655KK, M1305C
rNav1.4_C_IFC	SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	S641C, M1305C
Cmin1	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	Austausch der proximalen Hälfte des C-Terminus von rNav1.8 gegen entsprechende Nukleotide von rNav1.4 (AS 1736 – 1865 stammen aus rNav1.4)
Cmin2	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	AS 1736 – 1843 aus rNav1.4
Cmin3	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	AS 1839 – 1865 aus rNav1.4
4444c8	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	AS 1604 – 1840 in rNav1.4 ausgetauscht gegen AS 1736 – 1956 aus rNav1.8
4n8888	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	rNav1.8 mit N-Terminus aus rNav1.4 (AS 1 – 127)
4n8888c4	SCN10A/SCN4A (<i>Rattus norvegicus</i>)	rNav1.8 mit N-Terminus- und C-Terminus aus rNav1.4 (Kombination aus 4n8888 und 8888c4)

2.1.2 Mutagenese und DNA-Präparation

Die Planung und Kontrolle molekularbiologischer Arbeiten erfolgte mit Hilfe der Programme Vector NTI (InforMax, Frederick, MD, USA) und Bioedit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA).

Die in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp Nav-Kanäle sind Nav1.8 der Ratte (*SCN10A*, AAC52619, Akopian *et al.* (1996)) und des Menschen (*SCN10A*, NM_006514.2, OriGene Technologies Inc., Rockville, Maryland, USA), sowie Nav1.4 der Ratte (*SCN4A*, P13390; Trimmer *et al.* (1989)) und des Menschen (*SCN4A*, P35499).

Chimären aus rNav1.4 und rNav1.8 entstanden durch PCR-Amplifikation (Expand Polymerase Kit, Roche, Grenzach-Wyhlen, D) einzelner Domänen von Nav1.8. Dabei wurden, durch Einfügen stiller Mutationen in hochkonservierten Sequenzbereichen am Anfang und Ende jeder Domäne (siehe unten), Schnittstellen für Restriktions-Endonukleasen (New England Bioscience NEB, Ipswich, MA, USA) eingefügt, die ein Austauschen einzelner Domänen zwischen den Kanälen per Ligation (T4 Ligase, Fermentas, St. Leon-Rot, D) ermöglichten (Abb. 2-1).

Folgende Bereiche der cDNA-Sequenzen von rNav_v1.4 wurden so gegen die entsprechenden Nukleotid-Sequenzen von rNav_v1.8 ausgetauscht: 1-1328 (8444), 1329-3120 (4844), 3121-3863 (4484), 3864-5520 (4448), 1-3120 (8844), und 3121-5520 (4488) (Abb. 2-1).

Chimären kleinerer Kanalbereiche wie der N- und C-Termini, sowie die Porenschleifenchimäre 44(p8)4 wurden nach dem Prinzip der *Overlap-Extension-PCR* konstruiert (Ho *et al.*, 1989; An *et al.*, 2005). Dazu wurden PCR-Primer verwendet, die jeweils zur Hälfte auf der Nav_v1.4-Sequenz und zur anderen Hälfte auf der Nav_v1.8-Sequenz des jeweils zu erzeugenden Chimären-Überganges binden.

Alle Konstrukte deren Domäne-1 von rNav_v1.4 stammt, erhielten zudem die Punktmutation Y401S, wodurch Resistenz gegenüber TTX erzielt werden konnte. Diese und weitere Punktmutationen wurden eingefügt durch Subklonierung des betreffenden Kanalfragmentes in pGEM-T (pGEM-T Vector System I, Promega, Madison, WI, USA), anschließender Mutagenese mit dem QuikChange-System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) und Religation (T4 Ligase, Fermentas, Sankt Leon-Rot, D) in die Gesamtsequenz.

Die Deletion großer Sequenzabschnitte, wie bei der Erzeugung von hNav_v1.8–e11 erforderlich, erfolgte nach dem Prinzip der inversen PCR (Imai *et al.*, 1991; Hansson *et al.*, 2008) mit anschließender Phosphorylierung der Fragment-Enden und deren Ligation (T4 Ligase, Fermentas, Sankt Leon-Rot, D).

Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft (GATC-biotech, Konstanz, D). Die Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* unter Verwendung des Midi-plasmid purification kit (Qiagen, Hilden, D) und Pure-Yield plasmid purification kit (Promega GmbH, Mannheim, D) isoliert.

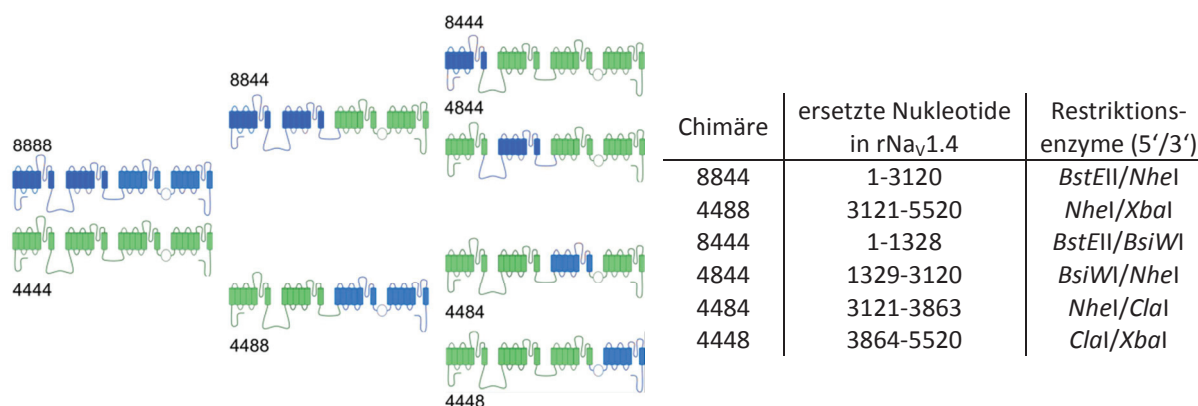


Abb. 2-1 Schema aller erzeugten Domänenchimären aus rNav_v1.8 (blau) und rNav_v1.4 (grün). Tabellarische Übersicht der durch rNav_v1.8 Nukleotide ersetzten Sequenzabschnitte in rNav_v1.4 und der zum Umsetzen der Domänen verwendeten Restriktionsenzyme.

2.2 Zellkultur, Transfektion und Bildgebung

Neuro-2A Zellen (DSMZ, Braunschweig, D) und ND7/23-Zellen (Universität Erlangen, D) wurden in 90% Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) versetzt mit 10% fötalem Kälberserum in einem 10% CO₂-Inkubator bei 37 °C kultiviert.

HEK293 (CAMR, Porton Down, Salisbury, UK) und tsA201-Zellen (Institut für Neurophysiologie, MH Hannover, D) wurden in 45% Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) und 45% Ham's F12 Medium, versetzt mit 10% fötalem Kälberserum in einem 5% CO₂-Inkubator bei 37 °C kultiviert.

Bei Erreichen von etwa 80% Konfluenz wurden die Zellen trypsiniert, mit frischem Medium verdünnt und in 35-mm Schälchen (Nunc, Thermo Scientific, Langensebold, D) ausgesät. Anschließend wurden die Zellen bei Erreichen von 30-50% Konfluenz transfiziert. Dazu wurde eine Mischung aus Nav-Kanal codierendem Plasmid und einem Vektor, welcher für das CD8-Antigen kodiert, im Verhältnis 5:1 (Superfect Transfection Kit, Quiagen) eingesetzt. Dynabeads (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, D), welche über anti-CD8-Antikörper an das CD8 Antigen binden, dienten der visuellen Identifizierung der transfizierten Zellen (Jurman *et al.*, 1994). Alle Messungen wurden innerhalb von 1-2 Tagen nach der Transfektion durchgeführt.

Die Bildgebung von EGFP-markierten Nav1.8-Kanälen erfolgte über ein 63x Ölimmersions-Objektiv in einem Axio Observer A1 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, D). Als Lichtquelle wurde das HBO Zeiss Illuminating System (Zeiss, MicroImaging Group, Göttingen, D) verwendet.

2.3 Elektrophysiologische Arbeiten

2.3.1 Die Methode der Spannungsklemme

Die elektrophysiologische Charakterisierung von Nav-Kanälen erfolgte mit Hilfe der Spannungsklemme in der Ganzzell-Konfiguration (*Whole-cell Patch-clamp* Technik), wie von Hamill *et al.* (1981) beschreiben. Als Expressionssysteme wurden HEK293, tsA201, Neuro-2A und ND7/23 Zellen verwendet. Diese wurden mit einem für den zu untersuchenden Nav-Kanal kodierenden Plasmid transfiziert. Zusätzlich wurde ein für das CD8-Antigen (Jurman *et al.*, 1994) kodierendes Plasmid zugegeben, um später mit Hilfe von an Dynabeads gekoppelten anti-CD8-Antikörpern die transfizierten Zellen optisch identifizieren zu können. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (19-21°C) durchgeführt.

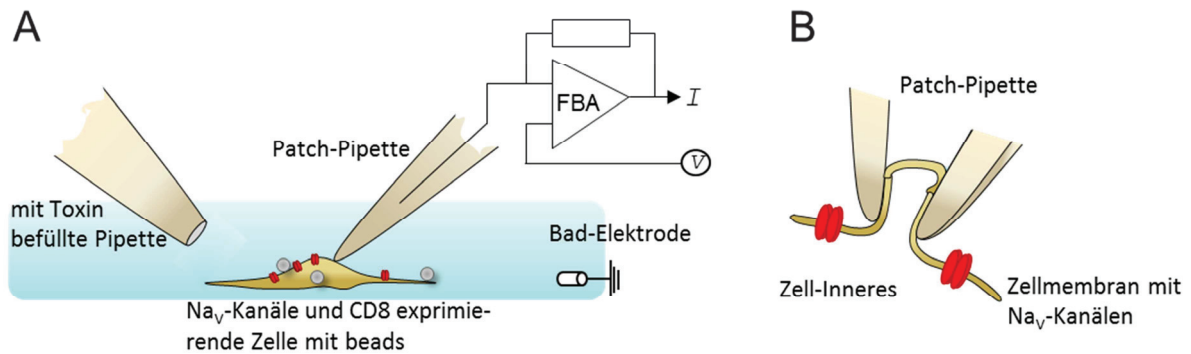


Abb. 2-2 **A** Schematischer Aufbau einer Messung im Ganzzell-Modus der Spannungsklemme mit vereinfachtem Schaltbild eines Verstärkers. **B** In der Ganzzell-Konfiguration wird das Zytoplasma durch eine definierte Ionenlösung ausgetauscht und es besteht elektrischer Zugang zum über der gesamten Zellmembran fließenden Strom.

In Abb. 2-2 ist der Aufbau eines *Patch-Clamp* Experimentes skizziert. Eine Zelle, die sowohl Na_V -Kanäle als auch CD8-Antigene exprimiert, befindet sich in einer mit der Badlösung gefüllten Messkammer, welche über die Badelektrode geerdet ist. Eine Glaspipette – die *Patch-Pipette* mit der Messelektrode – gefüllt mit einer bekannten Intrazellulär-Lösung (Abb. 2-2A) wird auf der Zellmembran aufgesetzt und durch Anlegen eines Unterdrucks wird eine sehr dichte Verbindung zwischen der Zellmembran und dem Pipettenglas hergestellt, so dass sich ein Widerstand von einigen $\text{G}\Omega$ bilden kann. Durch weiteres vorsichtiges Verstärken des Unterdrucks reißt dann die Membran unter der Aufsatzfläche der *Patch-Pipette* ein. In der so erreichten Ganzzell-Konfiguration (Abb. 2-2B) ist es möglich, die ganze Zellmembran auf gewünschte Potentialdifferenzen zu klemmen und die Leitfähigkeitsänderungen über der gesamten Zellmembran zu messen. Vor Beginn der eigentlichen Messung erfolgte eine 10-minütige Equilibrierungsphase beim Haltepotential von -120 mV , um den Austausch des Zytoplasmas mit der Pipettenlösung durch Diffusion zuzulassen und inaktivierte Kanäle wieder verfügbar werden zu lassen.

Es wurden *Patch-Pipetten* aus Kimax Borosilikat Glas mit einem Zugangswiderstand zwischen $0.9\text{--}1.5 \text{ M}\Omega$ verwendet. Der Serienwiderstand wurde zu 70-80% kompensiert, oder unter Verwendung der Autokompensationsfunktion der Software zu 30-50%, um Fehler in der Spannungsmessung zu minimieren. Gemessen wurde über einen EPC-10 Verstärker, gesteuert über PatchMaster-Software (HEKA Elektronik, Lambrecht, D). Die Daten wurden während der Messung mit einem 5 kHz Tiefpassfilter gefiltert und Leck- und kapazitive Ströme wurden mit einer $p/6$ -Methode korrigiert.

2.3.2 Messlösungen und applizierte Substanzen

Bei *Whole-Cell Patch-Clamp* Messungen wurden, sofern nicht anders angegeben, folgende Lösungen verwendet. Die Pipettenlösung (Intrazellulärlösung) enthielt (in mM): 35 NaCl, 105 CsF, 10 EGTA, 10 HEPES (pH 7.4, CsOH). Die Badlösung enthielt (in mM): 150 NaCl, 2 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7.4, NaOH). Bei Experimenten mit neuronalen Zellen (Neuro-2A, ND7/23) wurde der Badlösung außerdem 300 nM TTX zugesetzt, um die endogenen, TTX-sensitiven, Nav-Kanäle zu blockieren.

2.3.2.1 Chemikalien

Chloramin-T (ChT, para-Toluensulfonsäurechloramid Natrium-Salz, Trihydrat, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, D) wurde direkt vor Beginn einer Messung in Badlösung gelöst (10 mM) und auf die gewünschte Konzentration mit Badlösung verdünnt.

DTNP (2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin), Sigma-Aldrich, Steinheim, D) und DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurden in DMSO gelöst (100 mM) und bei -20 °C gelagert. Zur Applikation wurde mindestens eine 1:1000 Verdünnung mit Badlösung eingesetzt, um zytotoxische Effekte durch DMSO auszuschließen. Abb. 2-3 zeigt das Prinzip der kovalenten Modifikation einer Sulfhydrylgruppe eines Cysteins durch DTNP.

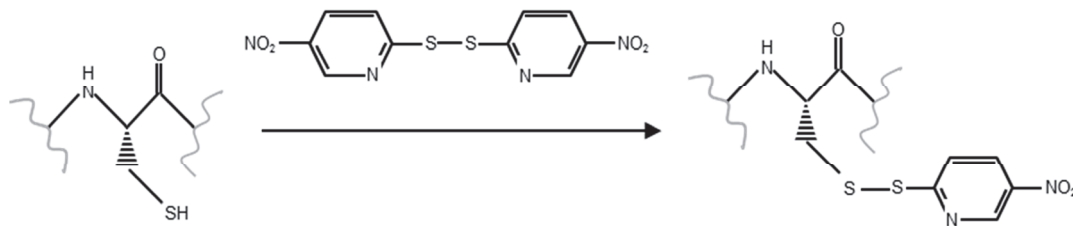


Abb. 2-3 Prinzip der kovalenten Modifikation der Sulfhydrylgruppe eines Cysteins durch DTNP.

Lucifer Yellow (Lucifer Gelb CH Dilithiumsalz, LY, Fluka, Sigma-Aldrich) wurde in Pipettenlösung (200 μ M) gelöst und konnte während einer 10-minütigen Equilibrierungsphase vor Beginn der eigentlichen Messung ins Zellinnere diffundieren. Bei Beleuchtung mit einer 50-W HBO-Lampe unter Verwendung eines 450–490-nm Anregungsfilters durch ein 10-fach-Luftobjektiv (Zeiss LD Achroplan) erfolgte die Radikalbildung.

Neomycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurde in der Pipettenlösung gelöst und eine Stammlösung (100 mM) bei -20 °C gelagert. Die Arbeitskonzentration betrug 5 mM. Die 10-minütige Equilibrierungsphase vor Beginn der eigentlichen Messung erlaubt die Diffusion der Substanz ins Zellinnere.

Forskolin (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) wurde in DMSO gelöst und in 50 mM Stammlösungen bei -20 °C gelagert. Experimentell wurden 10 μ M der Substanz in DMEM für jede Inkubation der Zellen frisch angesetzt.

2.3.2.2 Toxine

Tetrodotoxin (TTX, International Clinical Services, München, D) wurde in 100 mM Stammlösung bei -20 °C gelagert und vor der Messung der Badlösung in der Zielkonzentration 300 nM zugesetzt um endogene Ströme der neuronalen Zellen zu blockieren.

Weitere verwendete Toxine (μ O-MrVIA, α -LqhII, β -Tz1 und δ -SVIE) wurden zur Verhinderung von Aggregatbildung und Aktivitätsverlust mit Zusatz von 2 mg/ml BSA in Badlösung gelöst und die Aliquots bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Arbeitskonzentrationen betrugen: μ O-MrVIA 400 nM, α -Lqh2 20 nM, β -Tz1 5 μ M und δ -SVIE 2 μ M. Die gezielte Applikation von Toxinen und anderen Substanzen erfolgte über einen zweiten Mikromanipulator wie in Chen *et al.* (2000) beschrieben (Abb. 2-2A).

2.3.3 Datenaufnahme und -analyse

Die Aufnahme elektrophysiologischer Daten erfolgte mit PatchMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht, D), die Auswertung der Daten mit FitMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht, D) und Igor-Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA).

Messwerte werden als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*, Standardfehler des Mittelwertes) für die genannte Anzahl unabhängiger Experimente (n) angegeben, gegebenenfalls unter Berücksichtigung der Fehlerfortpflanzung. Zu vergleichende Datensätze wurden mittels zweiseitigem *Student's* t-Test auf statistische Signifikanz geprüft.

2.3.3.1 Schalteigenschaften von Na_v -Kanälen

Zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wurden Strom-Spannungs-Beziehungen für alle untersuchten Kanäle aufgenommen. Hierzu werden ausgehend von einem Haltepotential von -120 mV Depolarisationen im Bereich von -100 bis 60 mV in 10 mV-Schritten im Abstand von 5 s gegeben (Abb. 2-4A). Anschließend werden die bei jeder Spannung gemessenen Spitzenströme (Abb. 2-4B) über der Spannung aufgetragen und mit der linear-IV Gleichung angepasst (Abb. 2-4C):

$$I(V) = G_{\max}(V - E_{\text{rev}}) \frac{1}{\left(1 + e^{\frac{-(V - V_m)}{k_m}}\right)^3} \quad (2)$$

Dabei ist V_m die halbmaximale Aktivierungsspannung je Aktivierungstor und k_m der zugehörige Steigungsfaktor. k_m entspricht dem scheinbaren Ladungstransfer q während des Schaltvorgangs entsprechend der Beziehung $k_m = k_B \cdot T / q$ (k_B Boltzmann-Konstante, T absolute Temperatur). G_{\max} ist die maximale Leitfähigkeit aller Kanäle und E_{rev} das Umkehrpotential.

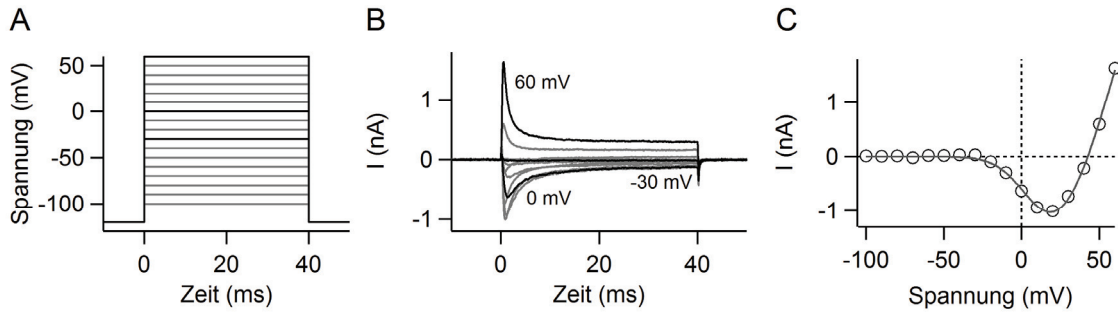


Abb. 2-4 Messung der Strom-Spannungs-Beziehung von Na_V-Kanälen. **A** Pulsprotokoll. **B** Mit in A gezeigter Serie von Depolarisationen aufgenommene Stromspuren von rNa_V1.8. Hervorgehoben sind die Spuren bei -30, 0 und 60 mV. **C** Durch Auftragen des Spitzenstromes jeder Stromspur über der zugehörigen Depolarisationsspannung erhält man die Strom-Spannungs-Beziehung. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung nach Gl. (2).

Die Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung kann durch Anpassen einer Stromantwort mit einer Hodgkin-Huxley-Funktion (Abb. 2-5) mit drei Aktivierungstoren (m^3) und einem Inaktivierungstor (h) mit einer schnell und einer langsam inaktivierenden Komponente (τ_{h1} , τ_{h2}) beschrieben werden:

$$I(t) = I_0 m^3 h^1 \quad (3)$$

dabei gilt für die Aktivierungskinetik die Beziehung:

$$m(t) = 1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}}$$

und der Abfall des Stromes wird beschrieben durch:

$$h(t) = h_{inf} + (1 - h_{inf}) \left[r_{12} e^{-\frac{t}{\tau_{h1}}} + (1 - r_{12}) e^{-\frac{t}{\tau_{h2}}} \right].$$

Bei einigen Auswertungen war es nötig, für bessere Anpassungen die hypothetische Anzahl der Aktivierungstore (m) als Variable zu behandeln. Die Zeitkonstante der Aktivierung ist τ_m , die Zeitkonstanten der Inaktivierung sind τ_{h1} und τ_{h2} . h_{inf} ist der Anteil des nicht-inaktivierenden Stromes und r_{12} das Verhältnis der schnell und der langsam inaktivierenden Amplitude. In die Zeit t fließt ein Verzögerungsfaktor ein (*delay*; $t = x\text{-delay}$), welcher theoretisch von der Anzahl der nötigen Schaltvorgänge bis zum Zustandsübergang (Aktivierung) abhängig ist, jedoch durch die Messsysteme (Zeitkonstanten des Filters etc.) beeinflusst wird.

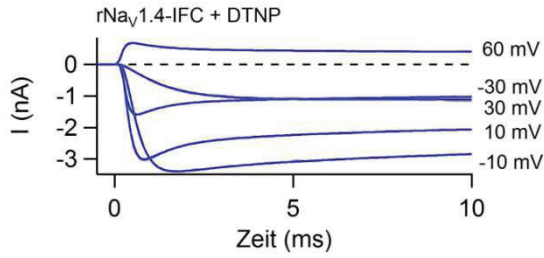


Abb. 2-5 Stromantworten (grau) von rNa_v1.4-IFC Kanälen nach Entfernung der schnellen Inaktivierung mit Anpassungen nach Gl. (3) (blau) mit Anpassung der Anzahl der Aktivierungstore m .

Zur Beschreibung der Gleichgewichtsinaktivierung wurden die Zellen ausgehend vom Haltepotential bei -120 mV für 500 ms mit einem Puls zwischen -130 mV und 10 mV alternierend in 10 mV-Schritten konditioniert. Die maximale Stromamplitude wurde jeweils bei einer anschließenden Depolarisation auf 0 mV bestimmt (Abb. 2-6). Das Wiederholungsintervall betrug 10 s oder, wenn erforderlich, 20 s. Folgende Boltzmann-Funktion beschreibt den Zusammenhang von gemessener maximaler Stromamplitude und Vorpuls-Spannung:

$$I(V) = \frac{I_{\max} - I_{\infty}}{1 + e^{\frac{-(V - V_h)}{k_h}}} + I_{\infty} \quad (4)$$

mit dem bei maximaler Inaktivierung vorliegenden Reststrom I_{\max} , dem ohne Inaktivierung verfügbaren Strom I_{∞} , der halbmaximalen Inaktivierungsspannung V_h und dem zugehörigen Steigungsfaktor k_h .

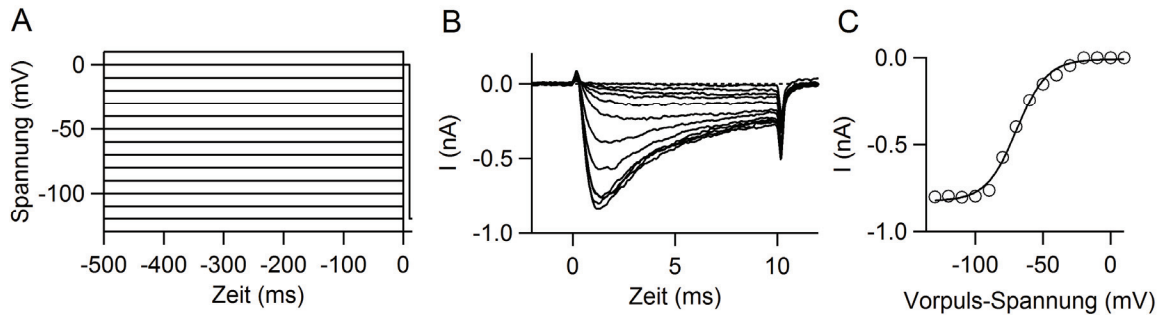


Abb. 2-6 Messung der Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung. **A** Pulsprotokoll. **B** Mit in **A** gezeigter Pulsserie aufgenommene Stromspuren. **C** Auftragung der Spitzenströme über der Konditionierungsspannung. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung nach Gl. (4).

Die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung wurde bestimmt durch zweimalige Aktivierung der Kanäle bei 0 mV mit variablem Zeitabstand zwischen diesen beiden Testpuls (Abb. 2-7 A, B). Das Verhältnis des Spitzenstromes beim zweiten Testpuls zum Spitzenstrom beim ersten Testpuls wird über dem Zeitintervall zwischen den Pulsen aufgetragen und mit einer doppelt exponentiellen Funktion angepasst:

$$\frac{I_2}{I_1}(t) = a_0 + a_1 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_{rec1}}} + a_2 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_{rec2}}} \quad (5)$$

mit den beiden Zeitkonstanten τ_{rec1} und τ_{rec2} entsprechend einer schnellen Amplitude a_1 und einer langsamen Amplitude a_2 .

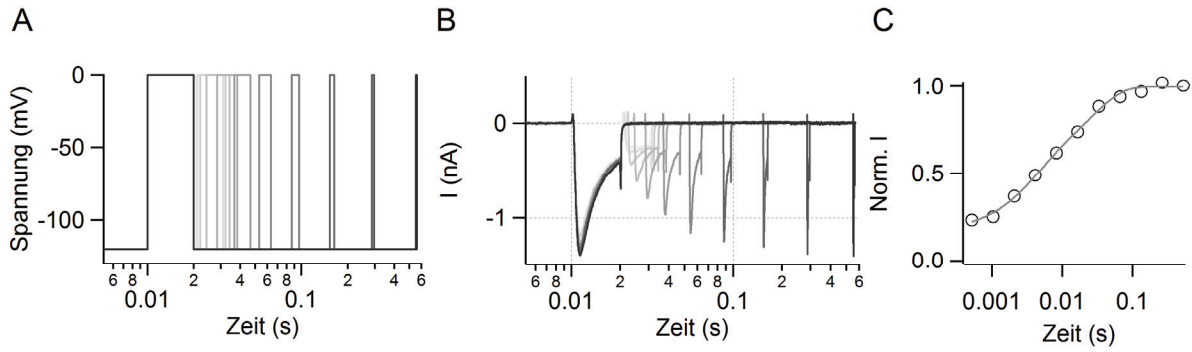


Abb. 2-7 Messung der Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung. **A** Pulsprotokoll. **B** Mit in A gezeigter Pulsserie aufgenommene Stromspuren. **C** Auftragung des Verhältnisses der Spitzenströme über dem Zeitintervall zwischen den 0 mV-Depolarisationen mit Anpassung nach Gl. (5).

2.3.3.2 Substanzapplikation

Während der Applikation von Toxinen und Chemikalien wurden im Abstand von 5 s Test-Depolarisationen auf 0 mV gegeben und der Spitzenstrom sowie das Verhältnis aus Strom nach 20 ± 1 ms (DTNP) oder 5 ± 0.5 ms (α -Lqh-II, δ -SVIE) und dem Spitzenstrom (*ratio*, *r*) über der Zeit aufgetragen.

In Abb. 2-8 ist beispielhaft die Entfernung der schnellen Inaktivierung durch Applikation von DTNP auf rNav1.8_IFC in Neuro-2A Zellen gezeigt. Der Verlauf des Spitzenstromes (Abb. 2-8C) und der Verlauf des Anteils des nicht-inaktivierenden Stromes (Abb. 2-8D) werden mit einfach-exponentiellen Funktionen (Gl. 6 für den Spitzenstrom, Gl. 7 für den Inaktivierungsverlust) beschrieben. Die Zeitkonstante des Effekteintritts bis zum Gleichgewicht ist τ_{on} , a_0 der Spitzenstrom zu Beginn und a_1 die Amplitudenänderung, r_0 und r_∞ der Anteil des nicht-inaktivierenden Stromes zu Beginn bzw. im Gleichgewicht:

$$I(t) = a_0 + a_1 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{on}}} \right) \quad (6)$$

$$r(t) = r_0 + (r_\infty - r_0) \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{on}}} \right) \quad (7)$$

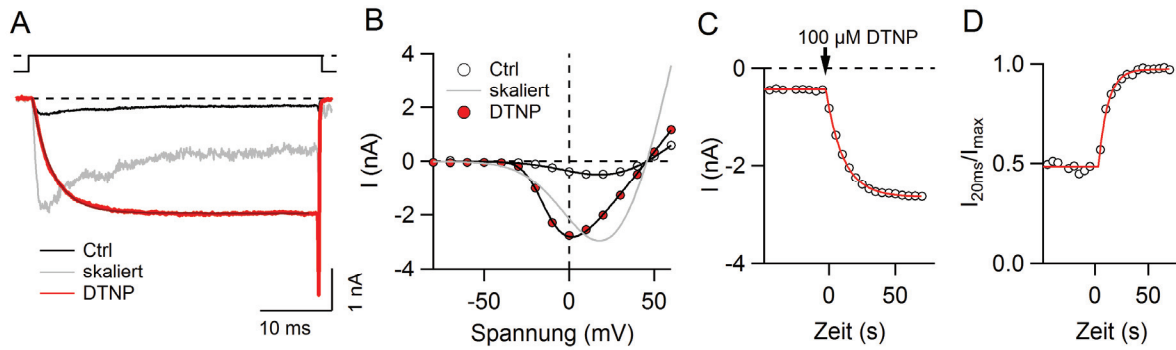


Abb. 2-8 Effekt von 100 μM DTNP auf $r\text{Na}_v1.8\text{-IFC}$. **A** Pulsprotokoll und Stromantworten auf 0 mV Depolarisationen vor (Ctrl, schwarz) und nach Applikation von 100 μM DTNP im Gleichgewicht (rot). Die dunkelrote, der Stromspur überlagerte, Linie ist eine einfach-exponentielle Anpassung nach Gl. (3). **B** Strom-Spannungs-Beziehungen vor (offene Kreise) und nach (rot) Applikation von 100 μM DTNP. Durchgezogene Linien sind Anpassungen nach Gl. (2). Grau ist die Anpassung vor Applikation skaliert auf die Auslenkung nach Applikation. **C** Änderung des Spitzenstromes bei Applikation von DTNP (Pfeil) mit Anpassung nach Gl. (6). **D** Änderung des Verhältnisses des Stromes nach 20 ± 1 ms im Verhältnis zum Maximalstrom bei Applikation von DTNP mit Anpassung nach Gl. (7).

Die Quantifizierung des Effektes von Chloramin-T erfolgte analog.

Jedoch wurde hier der Verlauf des Spitzenstromes und des Inaktivierungsverlustes mit einer Funktion der Form

$$1 - r(t) = 1 - r_0 - (r_\infty - r_0) \left(1 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau}}\right)^n \quad (8)$$

beschrieben, während der Exponent n mit 1 oder 2 konstant gehalten wurde. Es wurde das Verhältnis (r) des Stromes nach 10 ± 1 ms (Abb. 2-9A) zum Spitzenstrom als Funktion der Zeit aufgetragen und in Form des Inaktivierungsindexes, $1-r(t)$, nach Gl. (8) angepasst (Abb. 2-9B). r_0 ist der Anteil des nicht-inaktivierenden Stromes vor Applikation und r_∞ im Gleichgewicht. t_0 ist der Zeitpunkt des Reaktionsbeginns und τ die Zeitkonstante.

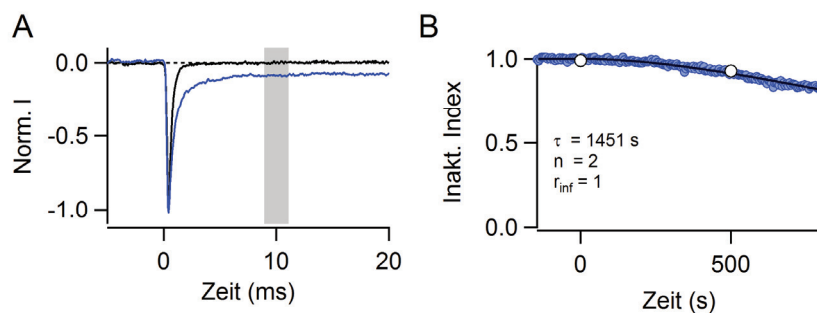


Abb. 2-9 Änderung des Inaktivierungsindex bei Applikation von 100 μM ChT auf $r\text{Na}_v1.4$ exprimiert in HEK293 Zellen. **A** Stromantworten auf 0 mV Depolarisationen vor (schwarz) und 500 s nach Applikation (blau) von 100 μM ChT. Der graue Balken zeigt den Bereich von 10 ± 1 ms, in dem der Inaktivierungsindex bestimmt wurde. **B** Änderung des Inaktivierungsindex bei Applikation von 100 μM ChT ($t = 0$). Die markierten Punkte entsprechen den in A gezeigten Stromspuren. Die durchgezogene Linie ist eine Anpassung nach Gl. (8) mit $n = 2$ und $r_\infty = 1$ und einer ermittelten Zeitkonstante von 1451 s.

2.3.4 Endogene Natriumströme neuronaler Zellen

Nav1.8 und Nav1.4 Orthologe des Menschen (hNav1.8 bzw. hNav1.4) und der Ratte (rNav1.8 bzw. rNav1.4) wurden in der Mausneuroblastom-Zelllinie Neuro-2A und der aus N18Tg2 Neuroblastom Zellen (Maus) und DRG-Neuronen (Ratte) gebildeten Hybridoma-Zelllinie ND7/23 (Wood *et al.*, 1990) heterolog exprimiert. Da es sich um neuronale Zelllinien handelt, findet man sowohl in Neuro-2A als auch in ND7/23-Zellen endogene, das heißt in nicht transfizierten Zellen vorhandene, Natriumströme (Abb. 2-10). Der mittlere maximale Einwärtsstrom bei 0 mV betrug 1.1 ± 0.3 nA in Neuro-2A Zellen ($n = 5$) bzw. 1.9 ± 0.4 nA in ND7/23-Zellen ($n = 13$) (Abb. 2-10D). Diese Ströme lassen sich vollständig durch die Applikation von 300 nM Tetrodotoxin blockieren (Abb. 2-10B-D).

Aufgrund seiner Resistenz gegen TTX kann heterolog exprimierter Nav1.8 in neuronalen Zellen isoliert betrachtet werden. Nav1.4 wird in Form einer gegenüber TTX-unempfindlichen Mutante, Nav1.4-Y401S, untersucht. Die Mutation befindet sich in der Domäne-1 Porenschleife (S5S6) – einem gering konservierten Bereich – und beeinflusst die Schalteigenschaften des Kanals nicht (Leffler *et al.*, 2005; Leipold *et al.*, 2011). Im Folgenden wird rNav1.4-Y401S als rNav1.4 Wildtyp bezeichnet.

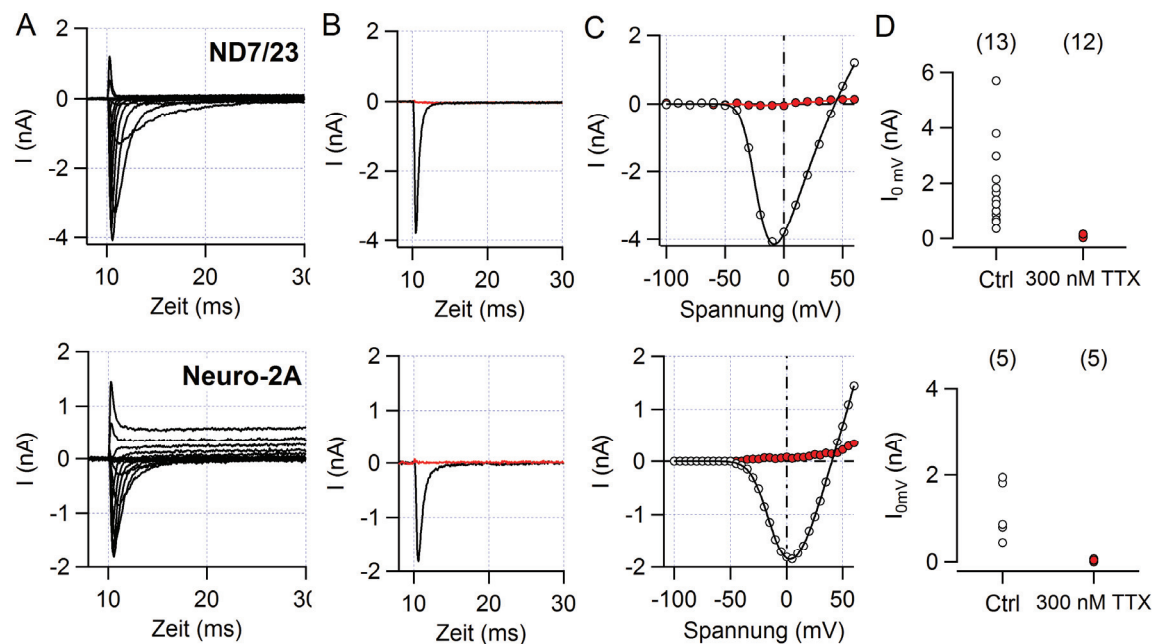


Abb. 2-10 Natriumströme gemessen an nicht transfizierten ND7/23- und Neuro-2A-Zellen **A** Stromspuren bei Depolarisationen ausgehend von -120 mV auf -100 mV bis 60 mV in 10 mV-Schritten. **B** Stromspuren bei 0 mV vor (schwarz) und nach (rot) Applikation von 300 nM TTX. **C** Strom-Spannungsbeziehungen vor (offene Kreise) und nach (rot) Applikation von 300 nM TTX mit Anpassungen nach Gl. (2). **D** Verteilung der Spitzenströme bei 0 mV vor (Ctrl) und nach Applikation von TTX.

3 Ergebnisse

3.1 Nav1.8 im Vergleich mit Nav1.4

Nav1.8 und Nav1.4 Orthologe des Menschen (hNav1.8 bzw. hNav1.4) und der Ratte (rNav1.8 bzw. rNav1.4) wurden in der Mausneuroblastom-Zelllinie Neuro-2A und der aus N18Tg2 Neuroblastom-Zellen (Maus) und DRG-Neuronen (Ratte) gebildeten Hybridoma-Zelllinie ND7/23 (Wood *et al.*, 1990) heterolog exprimiert. Mit Hilfe von *Whole-Cell Patch-Clamp* Experimenten sollten biophysikalische und pharmakologische Eigenschaften der Kanäle verglichen werden.

3.1.1 Schalteigenschaften von Nav1.4 und Nav1.8 in Neuro-2A-Zellen

Abb. 3-1A zeigt Stromspuren aufgenommen an mit rNav1.4, rNav1.8 bzw. hNav1.8 transfizierten Neuro-2A-Zellen und die zugehörigen Strom-Spannungs-Charakteristiken der Nav-Kanäle (Abb. 3-1B). Die Auswertung der Strom-Spannungs-Kennlinien (Abb. 3-1C, D) ermöglicht den Vergleich des Aktivierungsverhaltens.

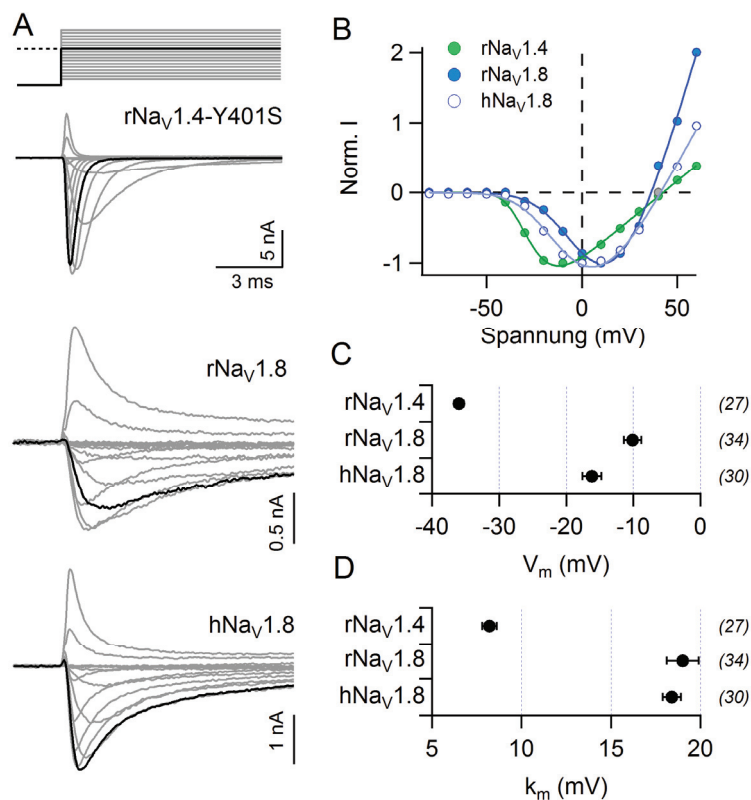


Abb. 3-1 Analyse von Nav-Kanälen nach heterologer Expression in Neuro-2A-Zellen. **A** Stromspuren von rNav1.4, rNav1.8 und hNav1.8 bei Depolarisationen von -120 mV auf -100 mV bis 60 mV. Hervorgehoben ist jeweils die Messung bei Depolarisation auf 0 mV. **B** Normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen der Zellen aus A mit Anpassung nach Gl. (2). **C** Halbmaximale Aktivierungsspannung je Tor (V_m). **D** Steigungsfaktor der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (k_m).

Beide Nav1.8 Orthologe erreichen verglichen mit rNav1.4 erst bei ca. 20 mV stärkerer Depolarisation die halbmaximale Aktivierung: V_m ist -16.0 ± 1.4 mV für hNav1.8 ($n = 30$), -10.1 ± 1.3 mV für rNav1.8 ($n = 34$) und -36.0 ± 0.7 mV ($n = 27$) für Nav1.4 ($P < 10^{-23}$ für rNav1.4 verglichen mit rNav1.8). Auch die Steigungsfaktoren unterscheiden sich signifikant zwischen Nav1.8 und Nav1.4 ($P < 10^{-13}$). Bei den Nav1.8 Orthologen (k_m ist 18.4 ± 0.5 mV für hNav1.8 und

19.0 ± 0.9 mV für rNav1.8) verläuft die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung deutlich flacher als bei rNav1.4 ($k_m = 8.2 \pm 0.4$ mV) (Abb. 3-1).

Anpassen der Stromspuren mit einer Hodgkin-Huxley-Funktion ermöglicht einen Vergleich der Kinetik und liefert die in Abb. 3-2 angegebenen Zeitkonstanten. Eine Analyse der Kinetik von hNav1.8 befindet sich in Kapitel 3.4.2.2 und wird hier aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgelassen. Die so ermittelten Aktivierungszeitkonstanten unterscheiden sich bei allen untersuchten Spannungen nicht zwischen den beiden Kanälen rNav1.4 und rNav1.8. Auffällig sind hingegen die Unterschiede in der Kinetik der schnellen Inaktivierung. Der Anteil der schnellen Komponente der schnellen Inaktivierung an der Gesamtamplitude ist bei rNav1.8 ~20% geringer und beträgt je nach Spannung zwischen 64 und 78% verglichen mit 88-99% bei rNav1.4. Die Zeitkonstante τ_{h1} ist bei rNav1.8 bei Depolarisation auf mehr als -10 mV um eine Größenordnung größer (z. B. bei 10 mV: 1.5 ± 0.3 ms bei rNav1.8 ($n = 19$)) als bei rNav1.4 (0.2 ± 0.0 ms ($n = 16$)). Auch die langsame Komponente der schnellen Inaktivierung ist bei rNav1.8 langsamer als bei rNav1.4, bei den Spannungen -10, 10 und 30 mV im Mittel um den Faktor 2. Außerdem ändern sich bei rNav1.8 die Inaktivierungszeitkonstanten kaum in Abhängigkeit von der Depolarisationsstärke, nur der Anteil der schnellen Komponente nimmt mit der Spannung zu. Im Gegensatz dazu werden bei rNav1.4 mit steigender Spannung die Zeitkonstanten kleiner und der Anteil der schnellen Komponente größer.

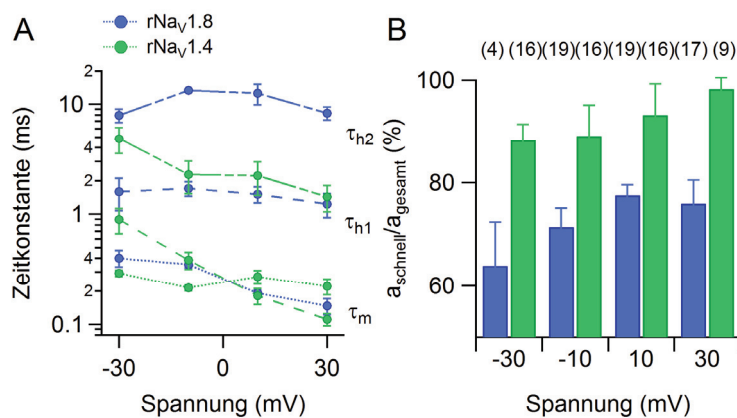


Abb. 3-2 Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik von rNav1.8 und rNav1.4-Kanälen exprimiert in Neuro-2A-Zellen. **A** Zeitkonstanten der Aktivierung (τ_m) und der Inaktivierung (τ_{h1} , τ_{h2}) ermittelt durch Anpassen einer Hodgkin-Huxley-Funktion an Stromantworten auf Depolarisation auf -30 mV, -10 mV, 10 mV und 30 mV. Datenpunkte sind durch Linien verbunden. **B** Anteil der schnellen Komponente an der Phase des Stromabfalls.

Die Gleichgewichtsinaktivierung (Abb. 3-3A, B) wird mit der halbmaximalen Inaktivierungsspannung V_h und einem Steigungsfaktor k_h charakterisiert. Nav1.8 der Ratte inaktiviert mit $V_h = -62.2 \pm 1.3$ mV ($n = 29$) bei etwas stärker depolarisierenden Spannungen als Nav1.4 ($V_h = -69.0 \pm 0.8$ mV; $n = 23$). Hingegen inaktiviert Nav1.8 des Menschen mit $V_h = -76.1 \pm 1.3$ mV ($n = 27$) bei deutlich hyperpolarisierenden Spannungen. Die Gleichgewichtsinaktivierung ist bei beiden Nav1.8 Orthologen weniger stark spannungsabhängig (k_h ist 8.0 ± 0.3 mV bei hNav1.8 und 8.3 ± 0.3 mV bei rNav1.8) als bei Nav1.4 ($k_h = 4.4 \pm 0.1$ mV).

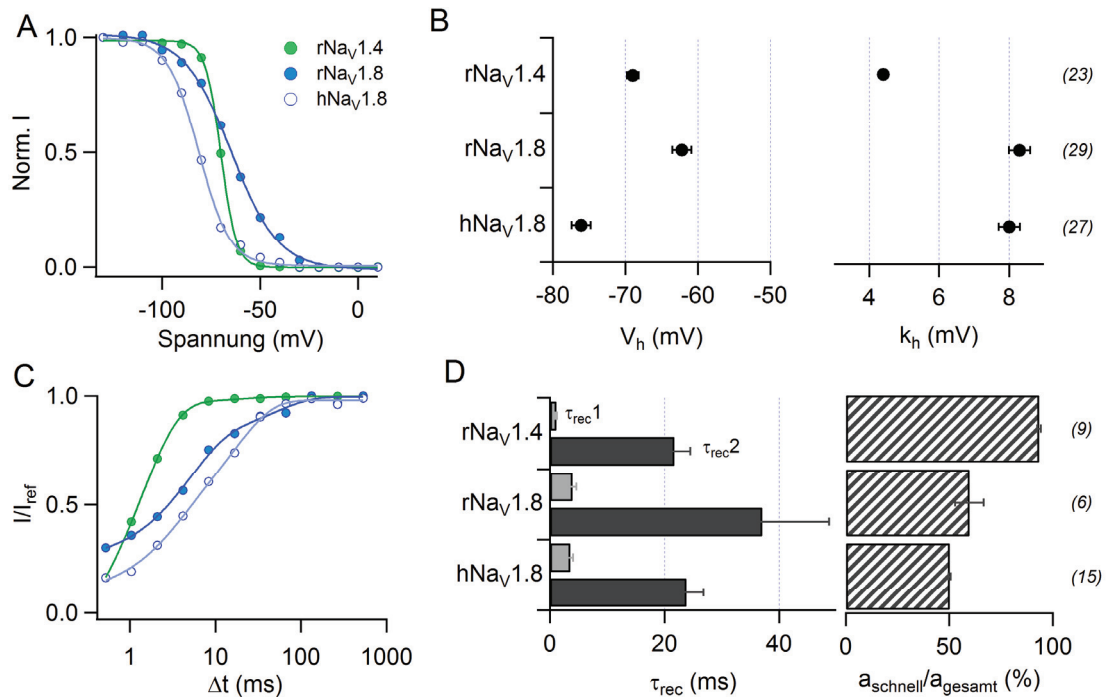


Abb. 3-3 A Gleichgewichtsinaktivierung repräsentativer, die angegebenen Na_V-Kanäle exprimierender, Neuro-2A-Zellen mit Anpassungen nach Gl. (4). **B** Mittelwerte der halbmaximalen Inaktivierungsspannung V_h und des Steigungsfaktors k_h für (n) Zellen. **C** Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung bei -120 mV für repräsentative Zellen mit doppelt-exponentieller Anpassung nach Gl. (5). **D** Zeitkonstanten der Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung (schnelle Komponente τ_{rec1} – hellgrau, langsame Komponente τ_{rec2} – dunkelgrau) sowie Anteil der schnellen Komponente am Gesamtverlauf.

Die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung bei einem Haltepotential von -120 mV (Abb. 3-3C, D) wird für Na_V1.4 und Na_V1.8 durch Anpassung mit einer doppelt exponentiellen Funktion beschrieben. Na_V1.4 besitzt eine sehr schnelle erste Komponente ($\tau_{rec1} = 1.1 \pm 0.1$ ms), welche fast die gesamte Amplitude beschreibt ($93.3 \pm 0.8\%$). Daneben findet man eine um eine Größenordnung größere zweite Zeitkonstante ($\tau_{rec2} = 21.7 \pm 2.8$ ms, n = 9). Beide Na_V1.8 Orthologe benötigen länger um wieder vollständig aktivierbar zu sein. Dabei befinden sich beide Zeitkonstanten in der gleichen Größenordnung wie bei Na_V1.4 ($\tau_{rec1} = 3.5 \pm 0.5$ ms bei hNa_V1.8 bzw. 3.9 ± 0.7 ms bei rNa_V1.8; $\tau_{rec2} = 23.8 \pm 3.0$ ms bei hNa_V1.8 bzw. 37.0 ± 11.7 ms bei rNa_V1.8). Jedoch ist der Anteil der schnellen Zeitkonstante an der Gesamtamplitude deutlich geringer ($51.5 \pm 3.6\%$ bei hNa_V1.8 (n = 15) und $59.7 \pm 6.9\%$ bei rNa_V1.8 (n = 6)). Dies führt dazu, dass Na_V1.4 bereits nach ca. 10 ms beim Haltepotential wieder vollständig aktiviert werden kann, beide Na_V1.8 Orthologe jedoch erst nach ca. 100 ms (Abb. 3-3).

Na_V1.4 und Na_V1.8-Kanäle weisen somit erhebliche Unterschiede in ihrem Schaltverhalten auf, wobei beiden Na_V1.8-Kanälen die von Na_V1.4 abweichenden Aktivierungseigenschaften gemeinsam sind, während sich die Inaktivierungsphänotypen der beiden Na_V1.8 Orthologen auch untereinander stärker unterscheiden.

3.1.2 Vergleich von rNav1.8 und hNav1.8 in ND7/23-Zellen

Als zweites neuronales Expressionssystem standen ND7/23-Zellen zur Verfügung. Aufgrund ihrer Herkunft, entsprechen diese Zellen stärker dem natürlichen Expressionssystem von Nav1.8, den DRG-Neuronen. Auch nach Expression in ND7/23-Zellen sind deutliche Unterschiede im Schaltverhalten von Nav1.8 der Ratte und des Menschen erkennbar (Abb. 3-4).

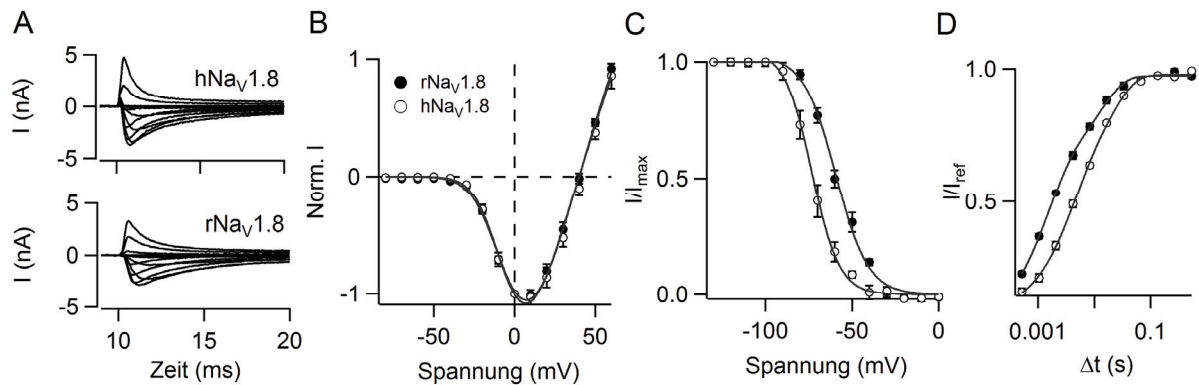


Abb. 3-4 Nav1.8 exprimiert in ND7/23-Zellen **A** Stromspuren von hNav1.8 (○) bzw. rNav1.8 (●) aufgenommen mit Depolarisationen ausgehend von -120 mV auf -100 mV bis 60 mV in 10 mV-Schritten. **B** Strom-Spannungs-Beziehungen mit Anpassungen nach Gl. (2). **C** Gleichgewichts-inaktivierung mit Anpassungen nach Gl. (4). **D** Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung mit Anpassungen nach Gl. (5). Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SEM für je 4-5 Zellen.

In den Parametern der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung unterscheiden sich Nav1.8 der Ratte und des Menschen in diesem Expressionssystem nicht: V_m ist -18.0 ± 1.1 mV für rNav1.8 ($n = 5$) und -16.6 ± 2.4 mV für hNav1.8 ($n = 4$). Auch die Steigungsfaktoren sind mit $k_m = 13.9 \pm 0.6$ mV für rNav1.8 und 14.5 ± 1.6 mV für hNav1.8 fast gleich, jedoch etwa 5 mV geringer als bei Expression in Neuro-2A-Zellen. Hingegen ist die halbmaximale Inaktivierung von hNav1.8 ($V_h = -73.6 \pm 2.1$ mV, $n = 4$) gegenüber rNav1.8 ($V_h = -59.6 \pm 1.5$ mV, $n = 5$) um 14 mV zu negativeren Spannungen verschoben ($P < 0.005$) und verläuft steiler (k_h ist 7.4 ± 0.2 mV bei hNav1.8 und 9.3 ± 0.4 mV bei rNav1.8; $P < 0.005$). Die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung erfolgt bei hNav1.8 ($\tau_{rec1} = 3.7 \pm 0.5$ ms, $\tau_{rec2} = 20.0 \pm 1.3$ ms, $r_{rec} = 52.3 \pm 4.5\%$, $n = 4$) signifikant (alle $P < 0.02$) langsamer als bei rNav1.8 ($\tau_{rec1} = 1.4 \pm 0.1$ ms, $\tau_{rec2} = 12.8 \pm 1.1$ ms, $r_{rec} = 60.4 \pm 1.3\%$, $n = 5$).

3.2 Molekulare Determinanten des Nav1.8-spezifischen Aktivierungsverhaltens

3.2.1 Schaltverhalten von Nav1.4/Nav1.8-Chimären

Zur molekularen Aufklärung der beschriebenen Unterschiede zwischen Nav1.4 und Nav1.8 wurden Chimären aus diesen Kanälen erzeugt und nach heterologer Expression in Neuro-2A-Zellen elektrophysiologisch charakterisiert. Das erste Chimärenpaar wurde konstruiert, indem jeweils die N-terminale oder die C-terminale Sequenzhälfte von rNav1.4 durch die entspre-

chenden Nukleotide von rNav1.8 ausgetauscht wurden. In Abb. 3-5A sind repräsentative Stromantworten dieser Chimären nach Expression in Neuro-2A-Zellen gezeigt.

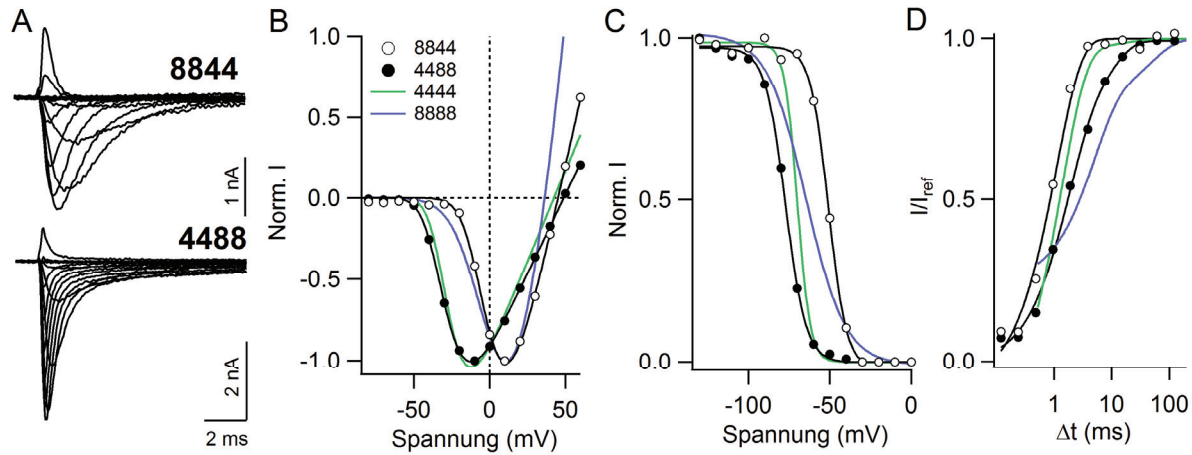


Abb. 3-5 Halbkanal-Chimären aus rNav1.4 und rNav1.8. **A** Stromspuren von 8844 bzw. 4488 aufgenommen an transfizierten Neuro-2A-Zellen mit Depolarisationen auf -100 bis 60 mV ausgehend von -120 mV. **B** Normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen für die Zellen aus A von 8844 (○) und 4488 (●) mit Anpassungen nach Gl. (2). **C** Normalisierte Gleichgewichtsinaktivierung mit Anpassungen nach Gl. (4). **D** Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung mit Anpassungen nach Gl. (5). Die farbigen Linien sind Daten repräsentativer Zellen von rNav1.4 (grün) und rNav1.8 (blau).

Der Vergleich der zugehörigen Strom-Spannungs-Beziehungen (Abb. 3-5B) mit denen der Wildtypen rNav1.4 und rNav1.8, weist auf Ähnlichkeiten von 4488 mit rNav1.4 und von 8844 mit rNav1.8 hin. Mit einer halbmaximalen Aktivierungsspannung $V_m = -34.1 \pm 1.3$ mV ähnelt die Aktivierung von 4488 der bei rNav1.4 beobachteten ($P > 0.2$). Jedoch ist die Steigung k_m mit 12.5 ± 0.5 mV ($n = 8$) deutlich flacher ($P < 10^{-5}$). Für 8844 ist $V_m = -14.7 \pm 1.2$ mV ($n = 19$) und entspricht somit fast dem rNav1.8 Wildtyp ($P = 0.012$), k_m ist mit 12.0 ± 0.7 mV jedoch deutlich geringer als bei rNav1.8 ($P < 10^{-7}$) und nicht verschieden von k_m von 4488. Alle ermittelten Parameter für die Chimären sind in Abb. 3-7 zur Übersicht vergleichend aufgetragen.

Bei Betrachtung der Gleichgewichtsinaktivierung (Abb. 3-5C) lässt sich hingegen keine einfache Übereinstimmung jeder Chimäre mit einem der beiden Wildtypen feststellen. Mit $V_h = -72.9 \pm 1.3$ mV und $k_h = 6.8 \pm 0.2$ mV bei 4488 ($n = 8$) ist die Gleichgewichtsinaktivierung von 4488 ähnlich der von rNav1.4. Die Chimäre 8844 besitzt jedoch mit $V_h = -55.0 \pm 1.5$ mV und $k_h = 5.8 \pm 0.2$ mV ($n = 14$) eine um mehr als 7 mV zu positiveren Spannungen verschobene Gleichgewichtsinaktivierung verglichen mit dem rNav1.8 Wildtyp-Kanal. Der Steigungsfaktor k_h ist bei beiden Chimären größer als bei rNav1.4, entspricht jedoch nicht dem für rNav1.8 bestimmten Wert (Abb. 3-7).

Für die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung (Abb. 3-5D) wurde bei beiden Chimären wie für die Wildtypen Nav1.4 und Nav1.8 ein doppelt exponentieller Verlauf bestimmt. Die schnellen Zeitkonstanten τ_{rec1} betragen 1.7 ± 0.1 ms (4488) bzw. 1.5 ± 0.1 ms (8844) und die langsa-

men Zeitkonstanten $\tau_{\text{rec}2}$ betragen 13.2 ± 1.1 ms (4488) bzw. 36.9 ± 12.0 ms (8844). Jedoch ist der Anteil der schnellen Amplitude bei 8844 mit $93.0 \pm 1.0\%$ ($n = 8$) deutlich größer als bei 4488 mit $71.0 \pm 2.0\%$ ($n = 6$) und ähnlich wie bei rNav1.4 (Abb. 3-7C). Die größte Übereinstimmung betreffend aller Parameter der Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung zeigt sich insgesamt zwischen 8844 und rNav1.4 (Abb. 3-7C).

Der Chimärensatz wurde vervollständigt, indem jede einzelne Domäne von rNav1.8 in den Hintergrund von rNav1.4 eingesetzt wurde. In Abb. 3-6A sind repräsentative Stromantworten der Chimären 8444, 4844, 4484 und 4448 gezeigt. Die Auswertung der Strom-Spannungs-Beziehungen (Abb. 3-6B, 3-7A) zeigt, dass die halbmaximale Aktivierungsspannung von 4844 mit $V_m = -13.6 \pm 1.8$ mV ($n = 16$) am ähnlichsten dem rNav1.8 Wildtypen ist. Die Aktivierung von 4484 ist mit $V_m = -41.3 \pm 0.9$ mV ($n = 19$) gegenüber rNav1.4 sogar 5 mV zu negativeren Spannungen verschoben. Die V_m -Werte der Chimären 8444 und 4448 liegen zwischen denen der Wildtypen (-22.8 ± 1.9 mV ($n = 12$) bei 8444 bzw. -28.3 ± 2.0 mV ($n = 10$) bei 4448), jedoch näher an den Werten von rNav1.4.

Die Steigungsfaktoren k_m liegen für 8444, 4484 und 4448 im Bereich zwischen 12 und 15 mV und damit zwischen den k_m -Werten der beiden Wildtypen (8.2 ± 0.4 mV bei rNav1.4 und 19.0 ± 0.9 mV bei rNav1.8). k_m von 4844 ist mit 16.5 ± 0.6 mV die stärkste Annäherung an k_m des rNav1.8 Wildtyp-Kanals (Abb. 3-7A).

Für die Parameter der Gleichgewichtsinaktivierung ergibt sich folgendes Bild: Mit $V_h = -66.0 \pm 1.3$ mV ($n = 19$) unterscheidet sich 4484 auch hier nicht vom rNav1.4-Wildtyp. Auch 4844 zeigt mit $V_h = -66.7 \pm 1.5$ mV ($n = 14$) eine mit rNav1.4 vergleichbare Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung. Bei 8444 ist $V_h = -61.5 \pm 2.1$ mV ($n = 11$) und damit vergleichbar mit rNav1.8 ($V_h = -62.2 \pm 1.3$ mV, $n = 29$). Im Gegensatz dazu ist bei 4448 die halbmaximale Inaktivierung verglichen mit allen anderen Chimären und Wildtypen mit -80.2 ± 3.1 mV ($n = 10$) um mehr als 10 mV zu negativeren Spannungen verschoben. Dabei ist der Steigungsfaktor k_h für 8444, 4844 und 4484 ähnlich und liegt zwischen 5.0 und 5.5 mV. Damit ist der Verlauf der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung etwas flacher als bei rNav1.4-Wildtyp. Bei 4448 beträgt k_h 6.9 ± 0.7 mV und ist damit dem rNav1.8 Wildtyp am ähnlichsten ($k_h = 8.3 \pm 0.3$ mV, $n = 29$) (Abb. 3-6C, 3-7B).

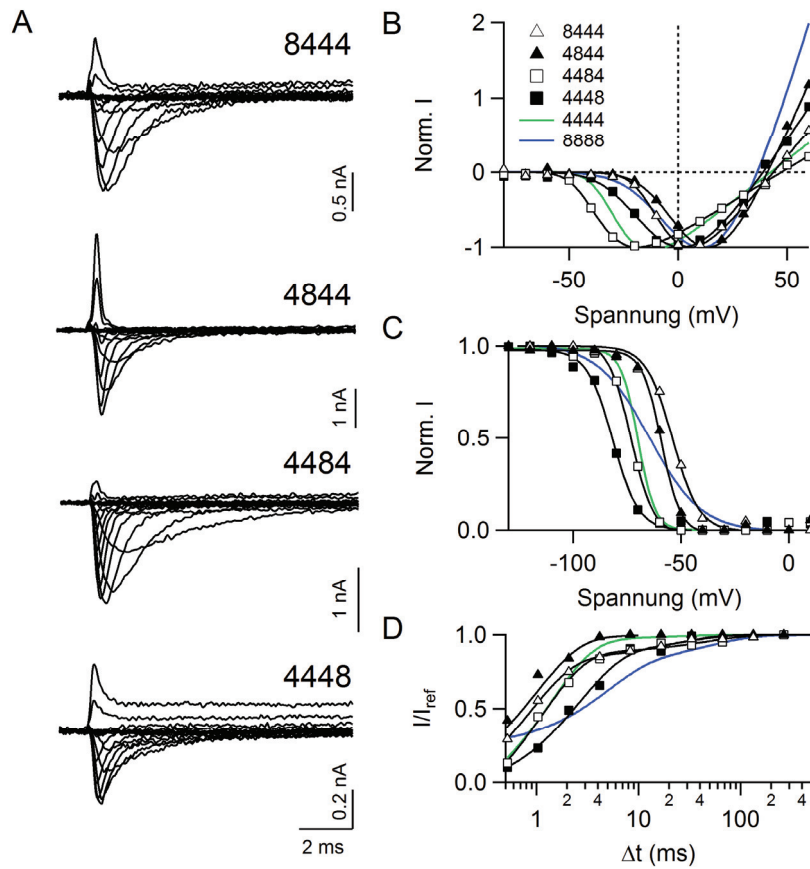


Abb. 3-6 Domänen-Chimären aus rNav_v1.4 und rNav_v1.8. **A** Stromspuren von 8444, 4844, 4484 bzw. 4448 aufgenommen an Neuro-2A-Zellen mit Depolarisationen von -100 bis 60 mV. **B** Normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen für die Zellen aus A von 8444 (\triangle), 4844 (\blacktriangle), 4484 (\square) und 4448 (\blacksquare) mit Anpassungen nach Gl. (2). **C** Normalisierte Gleichgewichtsinaktivierung mit Anpassungen nach Gl. (4). **D** Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung mit Anpassungen nach Gl. (5). Die farbigen Linien sind Daten repräsentativer Zellen von rNav_v1.4 (grün) und rNav_v1.8 (blau).

Die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung erfolgt bei allen Chimären sehr heterogen. Bei zwei Kanälen – 4844 und 4448 – liegt, im Gegensatz zu allen anderen Chimären und den beiden Wildtypen, ein einfach-exponentieller Kurvenverlauf vor (Abb. 3-6D, 3-7C). 4844 ist mit einer Zeitkonstante τ_{rec} von 1.5 ± 0.1 ms ($n = 11$) am schnellsten wieder aktivierbar. Für 4448 beträgt τ_{rec} 7.0 ± 1.7 ms ($n = 6$) und liegt damit zwischen den Werten für die schnelle und langsame Zeitkonstante der übrigen Chimären. 8444 und 4484 zeigen einen doppelt-exponentiellen Kurvenverlauf mit Anteilen der schnellen Komponente von $84.3 \pm 4.7\%$ ($n = 11$) bzw. $89.5 \pm 1.2\%$ ($n = 18$). Die Zeitkonstanten $\tau_{\text{rec}1}$ betragen 1.7 ± 0.3 ms (8444) und 1.1 ± 0.1 ms (4484), $\tau_{\text{rec}2}$ 12.9 ± 3.4 ms (8444) und 65.0 ± 36.4 ms (4484). Abb. 3-7 gibt einen Überblick über alle Schaltparameter der Chimären im Vergleich zu den Wildtypen.

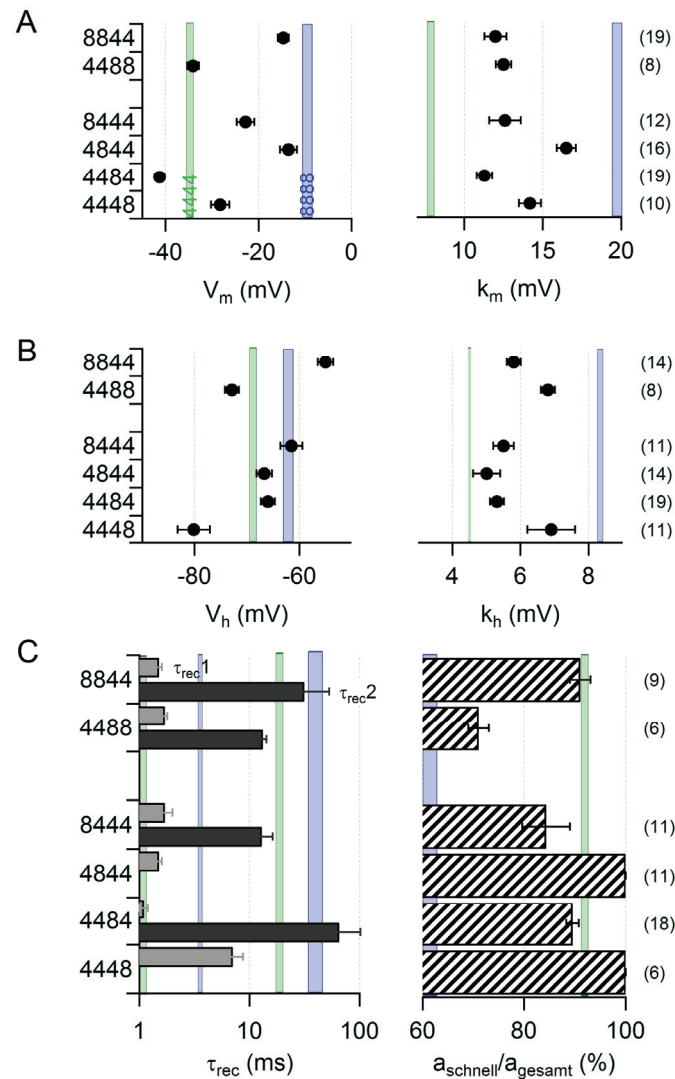


Abb. 3-7 Schaltparameter aller Na_v1.4/Na_v1.8 Chimären. **A** Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. **B** Gleichgewichtsinaktivierung. **C** Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung. Die farbigen Balken markieren die Werte \pm SEM für die Wildtypen rNa_v1.4 (grün) und rNa_v1.8 (blau).

Die Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung dieser Chimären wurde durch Anpassen einzelner Stromspuren mit einer Hodgkin-Huxley-Funktion (Gl. 3) ermittelt. In Abb. 3-8 sind die Zeitkonstanten der Aktivierung (τ_m) und der Inaktivierung (τ_{h1} und τ_{h2}) für die Halbkanalchimären und die Domänenchimären im Vergleich zu den Wildtypen aufgetragen. Die so ermittelten Zeitkonstanten der Aktivierung τ_m liegen alle im Bereich zwischen 110 μ s (4488 bei 30 mV) und 340 μ s (4844 bei -10 mV), nur bei 8844 ist τ_m je nach Stärke der Depolarisation zwischen 400 und 600 μ s. Damit aktiviert 8844 im Vergleich mit 4488 bei Spannungen \geq -10 mV im Mittel um den Faktor 3.3 langsamer (alle $P < 10^{-3}$) und sogar noch um den Faktor 2.3 langsamer als rNa_v1.8 (alle $P < 0.005$).

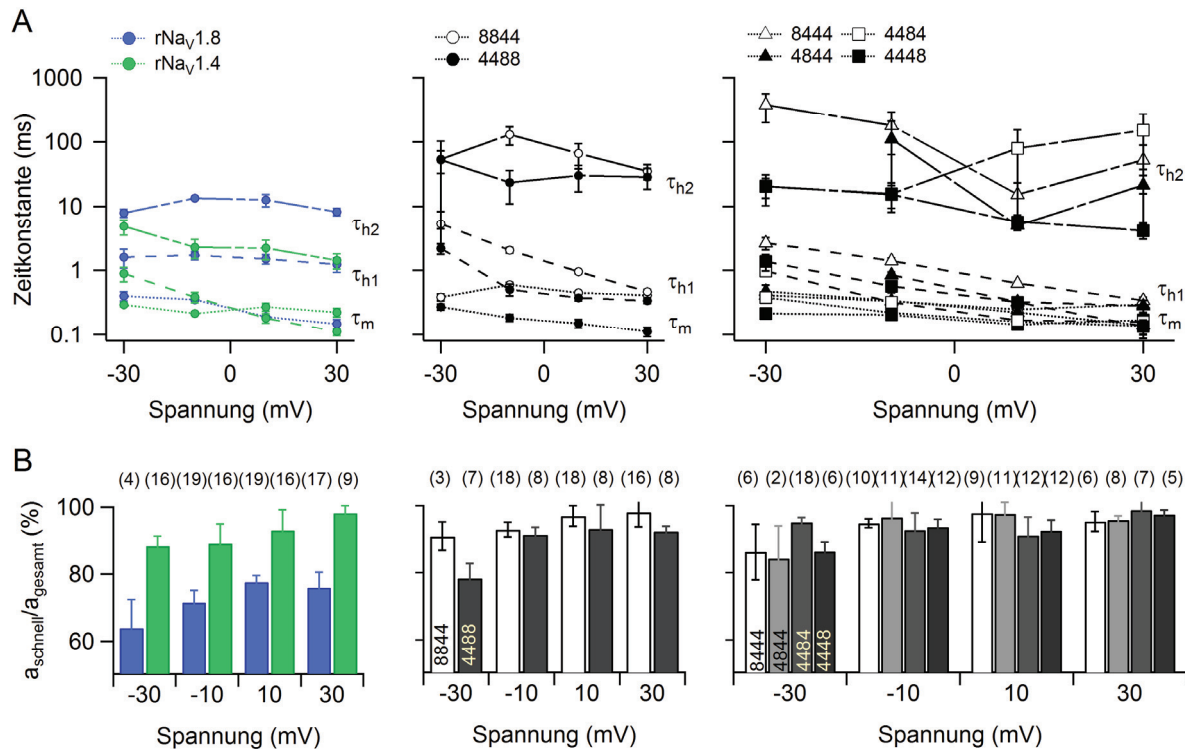


Abb. 3-8 Kinetik von Aktivierung und Inaktivierung der beiden Wildtypen, der Halbchimären und der Einzel-domänen-Chimären bei Depolarisation der Membran auf -30 mV, -10 mV, 10 mV bzw. 30 mV. **A** Zeitkonstanten ermittelt durch Anpassen einer Hodgkin-Huxley-Funktion mit $m = 3$ und $h = 1$. Gepunktete Linien verbinden die Zeitkonstanten der Aktivierung, τ_m . Eng und weit gestrichelte Linien verbinden die Datenpunkte der Inaktivierung mit schneller Zeitkonstante τ_{h1} bzw. langsamer Zeitkonstante τ_{h2} . **B** Anteil der schnellen Inaktivierungskomponente an der Gesamtamplitude.

Alle Chimären unterscheiden sich in Bezug auf die Zeitkonstante der schnellen Komponente der Inaktivierung τ_{h1} . Im Gegensatz zu rNaV1.8 wird τ_{h1} aber bei allen Chimären bei stärkerer Depolarisation kleiner. Bei -10 mV ist τ_{h1} zwischen $320 \pm 38 \mu\text{s}$ (4484) und $2.06 \pm 0.19 \text{ ms}$ (8844), bei 30 mV zwischen $135 \pm 36 \mu\text{s}$ (4448) und $468 \pm 36 \mu\text{s}$ (8844). Damit fällt erneut die Chimäre 8844 auf: Sie besitzt die langsamste schnelle Komponente der Inaktivierung, dicht gefolgt von 8444, welche je nach Spannung im Mittel um den Faktor 1.5 kleinere τ_{h1} aufweist. Die übrigen Chimären folgen mit abnehmender τ_{h1} in der Reihenfolge 4844 > 4448, 4488 > 4484. Der Anteil dieser schnellen Komponente am Inaktivierungsverlauf ist bei allen Chimären und über den gesamten Spannungsbereich zwischen 78% (4488 bei -30 mV) und 98% (8844 bei 30 mV), bei Spannungen $\geq -10 \text{ mV}$ ist er immer > 90%. Daher ist der Einfluss der langsamen Komponente bei keiner der Chimären so groß, wie bei rNaV1.8 ($a_{\text{schnell}}/a_{\text{gesamt}}$ 64 – 77%). In der Zeitkonstante der langsamen Komponente τ_{h2} zeigt sich eine größere Diversität zwischen den Chimären als bei τ_{h1} . Bei 4488 und 8844 ist τ_{h2} über den gesamten Spannungsbereich etwa eine Größenordnung größer als bei rNaV1.8 und fast zwei Größenordnungen größer als bei rNaV1.4. Beispielsweise beträgt bei -10 mV τ_{h2} für 4488 $23.4 \pm 12.5 \text{ ms}$, für 8844 $130 \pm 41 \text{ ms}$ (Abb. 3-8). Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass durch Kopplung der Aktivierungs- und Inak-

tivierungsprozesse auch die vordere Kanalhälfte Einfluss auf die makroskopische Inaktivierung nehmen kann.

Auf Basis der hier beschriebenen Daten lässt sich folgende Arbeitshypothese aufstellen. Das Nav1.8-spezifische, erst bei starken Depolarisationen einsetzende, Aktivierungsverhalten kann durch Einfügen der Domäne-2, zu einem geringeren Teil auch der Domäne-1, in rNav1.4 induziert werden. Es sollte daher möglich sein, die Funktionsweise molekular durch näheres Untersuchen des Domäne-2 Spannungssensors aufzudecken. Das Inaktivierungsverhalten hingegen – sowohl die Kinetik als auch die Spannungsabhängigkeit und die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung – ist durch das Zusammenwirken mehrerer oder aller Kanaldomänen bestimmt.

3.2.2 Aktivierungsschaltverhalten nach Entfernung der schnellen Inaktivierung

Um das charakteristische Aktivierungsverhalten von Nav1.8-Kanälen genau zu beschreiben und aufzuklären, ist es wegen der Kopplung von Aktivierungs- und Inaktivierungsprozessen notwendig, die Aktivierung isoliert zu betrachten. Das Ausschalten der Inaktivierung kann durch Modifikation des „IFM“-Inaktivierungsmotivs in der Domäne-3/4-Verbindung zu „IFC“ und anschließende chemische Modifikation des Cysteins ermöglicht werden: Ersetzt man das Methionin in diesem Motiv gegen Cystein, wird der Kanal sensitiv gegenüber Cystein-modifizierenden Agenzien wie dem membrangängigen DTNP (2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin)) (Schroll *et al.*, 2012). DTNP verursacht eine kovalente Modifikation des Cysteins im IFC-Motiv, wodurch die schnelle Inaktivierung von Nav-Kanälen verhindert wird (siehe Methoden).

3.2.2.1 Aktivierung von Nav1.4 und Nav1.8

Die Applikation von DTNP auf Nav1.8-IFM Kanäle bewirkt nur leichte Veränderungen der Stromantworten. Man beobachtet eine Verschiebung von V_m um etwa -10 mV, sowie einen Anstieg des Spitzenstromes bei Depolarisation auf 0 mV um etwa den Faktor zwei bei gleichzeitiger milder Verminderung der schnellen Inaktivierung (Anhang S1). Daher ist es erforderlich das IFM-Motiv zu IFC zu verändern.

Nav-Kanäle mit IFC-Motiv unterscheiden sich unter Kontrollbedingungen nicht signifikant von den IFM-Wildtypen hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Gleichgewichtsinaktivierung (Tab. 1, Anhang). Lediglich die schnelle Inaktivierung ist bei IFC-Kanälen unter Kontrollbedingungen weniger vollständig als bei IFM-Kanälen, das heißt der 10 ms-Inaktivierungsindex, $1 - I_{10ms}/I_{max}$, ist kleiner: für rNav1.8-IFM 0.69 ± 0.02 ($n = 34$) und für rNav1.8-IFC 0.53 ± 0.05 ($n = 14$), für rNav1.4-IFM 0.99 ± 0.00 ($n = 24$) und für rNav1.4-IFC 0.96 ± 0.02 ($n = 5$). Die Werte für alle Chimären finden sich in Tabelle 2 im Anhang.

Die Applikation von 100 μM DTNP auf $\text{Na}_v1.8$ -IFC bewirkt einen schnellen und vollständigen Verlust der schnellen Inaktivierung in weniger als einer Minute ($\tau_{\text{on}} = 3.4 \pm 1.0$ s bei $\text{rNa}_v1.8$ -IFC ($n = 21$) bzw. 10.8 ± 1.6 s bei $\text{hNa}_v1.8$ -IFC ($n = 12$)). Stromantworten repräsentativer Zellen vor und nach der Applikation sind in Abb. 3-9A gezeigt. Die Entfernung der schnellen Inaktivierung bewirkt dabei eine Steigerung der Stromamplitude um $400 \pm 60\%$ ($n = 21$) bei $\text{rNa}_v1.8$ -IFC. Interessanterweise ist bei $\text{hNa}_v1.8$ -IFC der Anstieg der Stromamplitude mit $1370 \pm 235\%$ ($n = 11$) noch deutlich prominenter (Abb. 3-9). Zum Vergleich beträgt der Anstieg bei $\text{rNa}_v1.4$ -IFC nur $44.3 \pm 4.5\%$ ($n = 5$). Abb. 3-9B zeigt die Strom-Spannungskennlinien vor und nach Applikation von DTNP. $V_{\text{m, Ctrl}}$ beträgt bei $\text{rNa}_v1.8$ -IFC -12.1 ± 2.4 mV und $k_{\text{m, Ctrl}}$ beträgt 17.8 ± 0.8 mV ($n = 14$), wohingegen nach Entfernung der schnellen Inaktivierung $V_{\text{m, DTNP}}$ -23.3 ± 2.4 mV und $k_{\text{m, DTNP}}$ 10.2 ± 0.6 mV ($n = 16$) beträgt. Bei $\text{hNa}_v1.8$ -IFC kann eine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung V_{m} von -1.3 ± 2.9 mV ($n = 7$) unter Kontrollbedingungen auf -21.3 ± 2.4 mV ($n = 13$) nach Entfernung der Inaktivierung beobachtet werden. Der Steigungsfaktor k_{m} verringert sich von $k_{\text{m, Ctrl}} = 23.8 \pm 2.2$ mV auf $k_{\text{m, DTNP}} = 10.3 \pm 0.8$ mV (Abb. 3-9C).

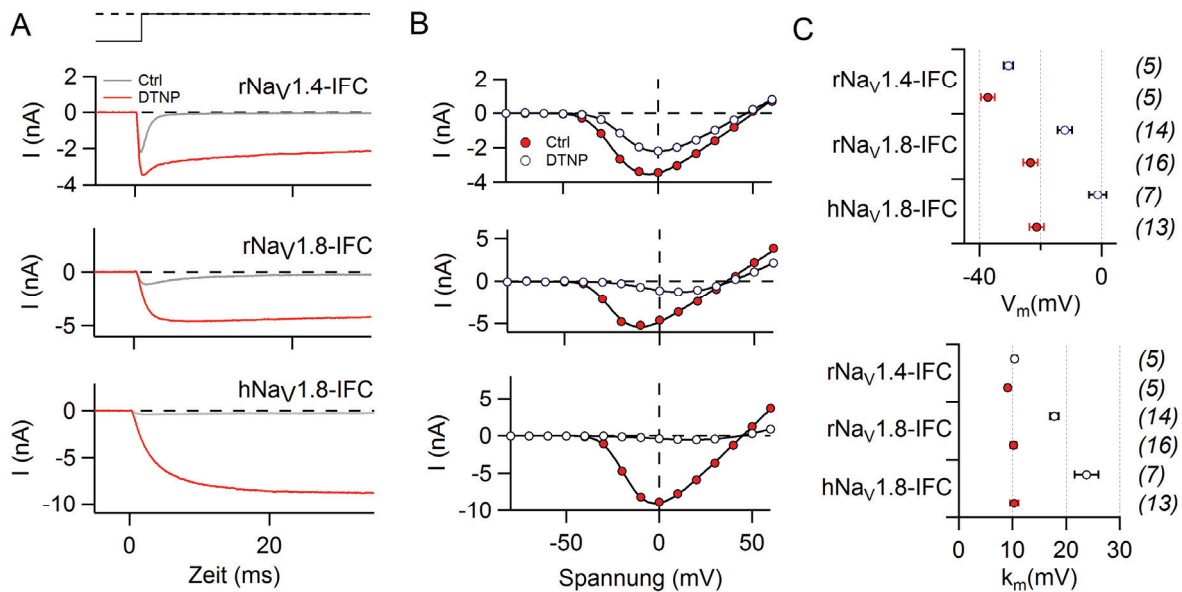


Abb. 3-9 Vergleich des Schaltverhaltens von $\text{rNa}_v1.4$ -IFC, $\text{rNa}_v1.8$ -IFC und $\text{hNa}_v1.8$ -IFC vor und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung durch Applikation von 100 μM DTNP. **A** Stromantworten auf depolarisierende Spannungspulse ausgehend von -120 mV auf 0 mV für $\text{rNa}_v1.4$ -IFC, $\text{rNa}_v1.8$ -IFC und $\text{hNa}_v1.8$ -IFC unter Kontrollbedingungen (Ctrl, grau) und unter DTNP (rot). **B** Strom-Spannung-Kennlinien der Zellen aus A unter Kontrollbedingungen (\circ) und nach Applikation von DTNP (\bullet) mit Anpassungen nach Gl. (2). **C** V_{m} (oben) und k_{m} (unten) vor (\circ) und nach (\bullet) Applikation von DTNP.

Nach Entfernung der schnellen Inaktivierung zeigt sich bei $\text{rNa}_v1.4$ -IFC nur eine leichte Verschiebung von V_{m} hin zu weniger depolarisierenden Spannungen (-37.3 ± 2.2 mV, $n = 5$) und eine leichte Verringerung des Steigungsfaktors ($k_{\text{m, DTNP}} = 9.1 \pm 0.5$ mV) (Abb. 3-9). Nach Entfernung der Inaktivierung sind somit der Steigungsfaktor und damit die apparenten Schaltladun-

gen der Aktivierung bei rNav1.4 und rNav1.8 sowie hNav1.8 sehr viel ähnlicher als dies unter Kontrollbedingungen ersichtlich ist (Abb. 3-9).

Bei Betrachtung der Aktivierung nach Entfernung der Inaktivierung wird auch die wahre Aktivierungskinetik ersichtlich. Man stellt fest, dass die Anpassung der Stromantworten mit einem Hodgkin-Huxley-Modell mit $m = 3$ nicht zu einer guten Übereinstimmung mit den Daten bei allen Spannungen führt. Daher wurde der Exponent m , also die hypothetische Anzahl der Aktivierungstore, als Parameter angepasst. In Abb. 3-10A sind Stromantworten von rNav1.4, rNav1.8 und hNav1.8 nach Entfernung der Inaktivierung für ausgewählte Spannungen mit den so erhaltenen Anpassungen gezeigt. hNav1.8 zeigt bei allen Spannungen einen annähernd einfach-exponentiellen Kurvenverlauf, man erhält für alle Spannungen im Mittel einen Exponenten $m = 0.76 \pm 0.06$ ($n = 5$). Die Aktivierungszeitkonstante τ_m beträgt 12.6 ± 4.9 ms bei Depolarisation auf -30 mV und verringert sich bis auf 0.8 ± 0.1 ms bei $+60$ mV (Abb. 3-10). Ähnlich verhält sich auch rNav1.8. Die besten Anpassungen des Modells sind mit $m = 1.07 \pm 0.15$ bei -30 mV bis 30 mV möglich; bei 60 mV ist m schließlich 3.32 ± 1.15 ($n = 5$). Bei Depolarisation auf -30 mV ist die Zeitkonstante τ_m ähnlich wie bei hNav1.8 (11.5 ± 5.8 ms), bei stärkeren Depolarisationen nimmt diese bei rNav1.8 jedoch stärker ab, die Aktivierung wird schneller. Bei 60 mV ist $\tau_m = 234 \pm 39$ μ s und somit um den Faktor 3.2 kleiner als bei hNav1.8 (Abb. 3-10B).

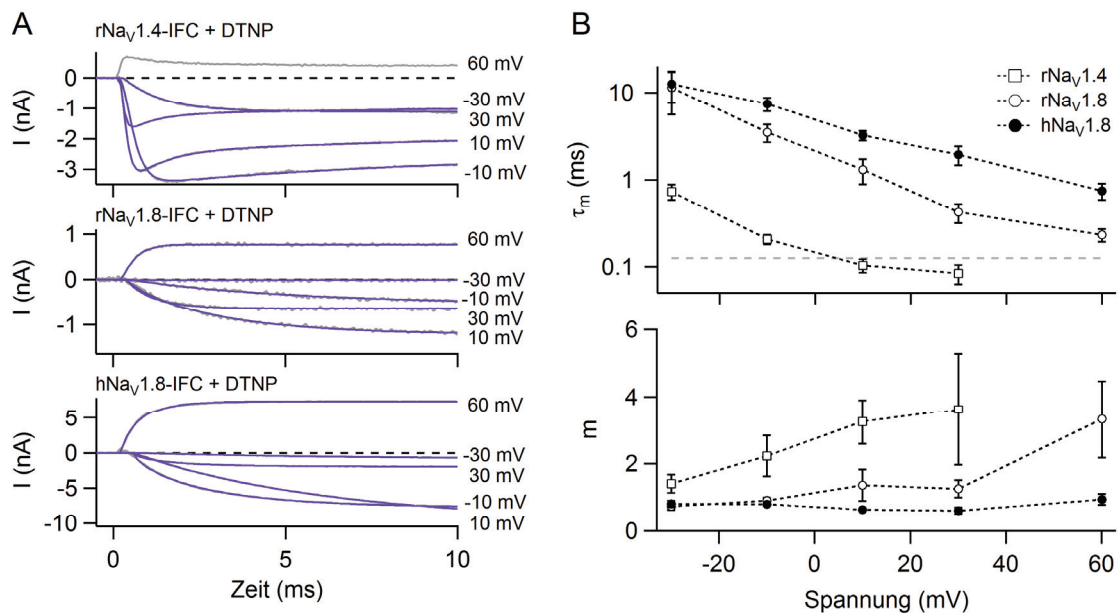


Abb. 3-10 Anpassung der Aktivierungskinetik (bei rNav1.4 auch der Inaktivierungskinetik, da unter DTNP keine vollständige Entfernung der Inaktivierung erfolgt). **A** Stromantworten repräsentativer Zellen (grau) und Anpassungen nach Gl. (3) (blau). **B** Aktivierungszeitkonstanten τ_m (oben) und die Anzahl der Aktivierungstore m (unten) sind für ausgewählte Spannungen aufgetragen (Mittelwerte für je 5 Zellen \pm SEM). Die grau gestrichelte Linie markiert die durch den bei Datenaufnahme verwendeten 5 kHz Bessel-Filter realisierbare Zeitauflösung.

Ein anderes Bild ergibt sich bei rNav1.4. Die Größe des Exponenten ist hier scheinbar stärker von der Spannung abhängig. Bei -30 mV ist $m = 1.41 \pm 0.27$ ($n = 5$), bei stärkeren Depolarisationen nimmt die Sigmoidität zu, bis bei 10 mV ein Exponent m von 3.24 ± 0.66 erreicht wird. Die Zeitkonstanten sind hier bei -30 mV $741 \pm 145 \mu\text{s}$ und bei 10 mV $104 \pm 18 \mu\text{s}$ und somit um mehr als eine Größenordnung kleiner als bei den beiden Nav1.8 Orthologen (Abb. 3-10B). Der bei Aufnahme der Daten verwendete 5 kHz Bessel-Filter lässt eine maximale zeitliche Auflösung im Bereich von etwa $150 \mu\text{s}$ zu (grau gestrichelte Linie in Abb. 3-10B). Daher spiegeln die für rNav1.4-IFC bei Spannungen positiver als -10 mV ermittelten Werte nicht das wirkliche Schalten des Kanals wider, sondern sind mit einem systematischen Fehler behaftet. Auch die hohen Werte für m bei rNav1.8 bei 60 mV müssen tendenziell kritisch betrachtet werden.

Hierin zeigt sich, dass der Verlauf von Nav1.8 Stromspuren unter Kontrollbedingungen enorm von einer gegenüber der sehr langsamen Aktivierung schnellen Inaktivierung dominiert wird. Zudem führt die Anwendung des klassischen Hodgkin-Huxley-Modells (Hodgkin & Huxley, 1952) mit $m = 3$ nicht zu zufriedenstellenden Anpassungen der Stromspuren. Die Aktivierung von Nav1.8-Kanälen wird besser mit $m = 1$ beschrieben, was ein Hinweis auf das Vorhandensein eines limitierenden, langsam aktivierenden, Schalters ist.

3.2.2.2 Aktivierungsschaltverhalten der Nav1.4/Nav1.8-Chimären

Auch bei allen Nav1.4/Nav1.8 Chimären zeigen sich deutlich Unterschiede im Aktivierungsverhalten nach Entfernung der schnellen Inaktivierung. Bereits bei Betrachtung der Halbchimären 8844 und 4488 (Abb. 3-11) werden Unterschiede deutlich. Zunächst fällt auf, dass die Inaktivierung bei 4488 wie auch bei rNav1.4 nicht komplett entfernt wird (Abb. 3-11A). Die Aktivierungsspannung je Aktivierungstor V_m verschiebt sich verglichen mit Kontrollbedingungen von -31.7 ± 0.9 mV auf -43.6 ± 0.9 mV bei 4488 und von -12.6 ± 1.7 mV auf -17.0 ± 1.1 mV bei 8844 (jeweils $n = 5$) (Abb. 3-11B, C). Somit aktiviert 4488 bei weniger depolarisierenden Spannungen als rNav1.4 ($P = 0.025$) und 8844 bei stärker depolarisierenden Spannungen als rNav1.8 ($P = 0.027$) (Abb. 3-11C). Die Steigungsfaktoren k_m sind bei beiden Chimären nach Entfernung der Inaktivierung wie bei rNav1.4 (8.4 ± 0.8 mV bei 4488 und 8.8 ± 0.2 mV bei 8844) und damit ist die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung stärker ausgeprägt als bei rNav1.8 (10.3 ± 0.8 mV), jedoch nicht signifikant ($P > 0.06$).

In Abb. 3-12A sind Stromantworten aller Einzeldomänenchimären vor und nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DTNP gezeigt. Bei Betrachtung der Strom-Spannungs-Beziehungen fällt auf, dass

sich bei 4844 ein besonders starker Unterschied zwischen Kontrollbedingungen und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung zeigt (Abb. 3-12B).

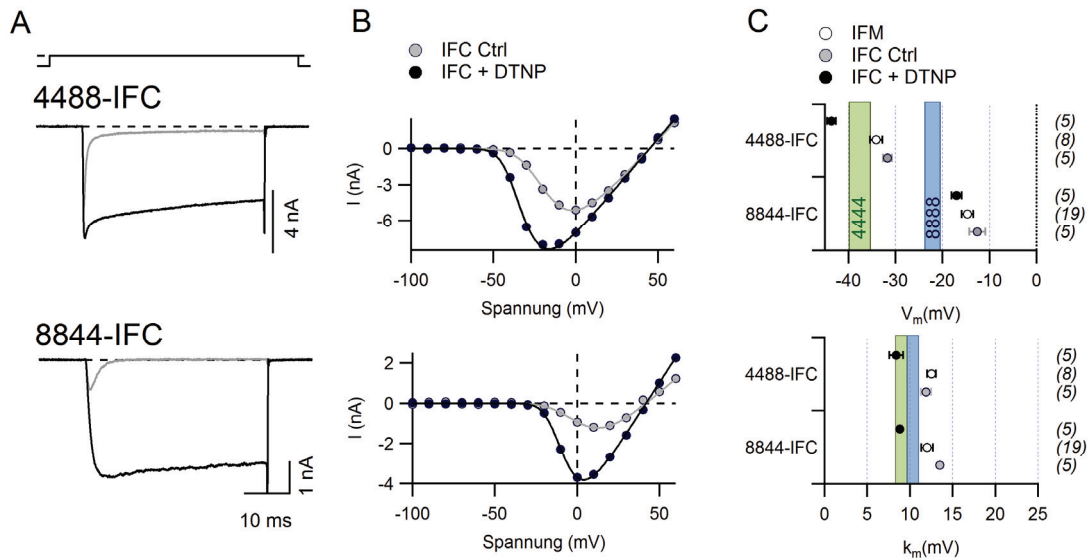


Abb. 3-11 Aktivierungsschaltverhalten von 4488-IFC und 8844-IFC vor und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung mittels DTNP. **A** Stromantworten auf depolarisierende Spannungspulse ausgehend von einem Haltepotential von -120 mV auf 0 mV für 4488-IFC und 8844-IFC unter Kontrollbedingungen (grau) und unter DTNP (schwarz). **B** Strom-Spannungskennlinien von 4488-IFC (oben) und 8844-IFC (unten) unter Kontrollbedingungen (●) und nach Applikation von DTNP (●) mit Anpassungen nach Gl. (2). **C** V_m (oben) und k_m (unten) vor (●) und nach (●) Applikation von DTNP für 4488-IFC und 8844-IFC sowie 4488-IFM und 8844-IFM (○) (Mittelwerte \pm SEM).

V_m verschiebt sich um -18.0 ± 1.3 mV, k_m um -11.1 ± 1.5 mV. Bei 8444 zeigen sich so starke Verschiebungen nicht ($\Delta V_m = -3.9 \pm 1.4$ mV, $\Delta k_m = -4.0 \pm 0.5$ mV), die Parameter dieser Chimäre entsprechen nach Entfernung der Inaktivierung jedoch wie bei 4844 auch denen des rNav1.8-IFC Kanals (Abb. 3-12C). 4484 verhält sich ähnlich wie rNav1.4. Interessanterweise ist bei 4448 die Aktivierung unter Kontrollbedingungen gegenüber rNav1.4 zu stärker depolarisierenden Spannungen verschoben. Entfernung der schnellen Inaktivierung bewirkt hier jedoch eine starke Verschiebung von V_m um -12.8 ± 0.8 mV und von k_m um -3.1 ± 0.9 mV, so dass die Aktivierung dieser Chimäre sogar bei weniger depolarisierenden Spannungen verglichen mit rNav1.4 erfolgt. Bei allen Chimären sind die Steigungsfaktoren k_m nach Entfernung der Inaktivierung nicht signifikant verschieden untereinander und gegenüber rNav1.4-IFC + DTNP und rNav1.8-IFC + DTNP (Abb. 3-12C).

Als auffälliger Parameter zeigt sich auch bei den Chimären der Anstieg der Stromamplitude, welcher mit der Entfernung der schnellen Inaktivierung verbunden ist (Abb. 3-13A). Wie bereits beschrieben, steigt bei rNav1.4 der Spitzenstrom bei 0 mV nur um den Faktor 1.4 ± 0.1 ($n = 5$) an, bei rNav1.8 hingegen um den Faktor 5.0 ± 0.6 ($n = 21$) und bei hNav1.8 sogar um den Faktor 14.7 ± 2.4 ($n = 11$).

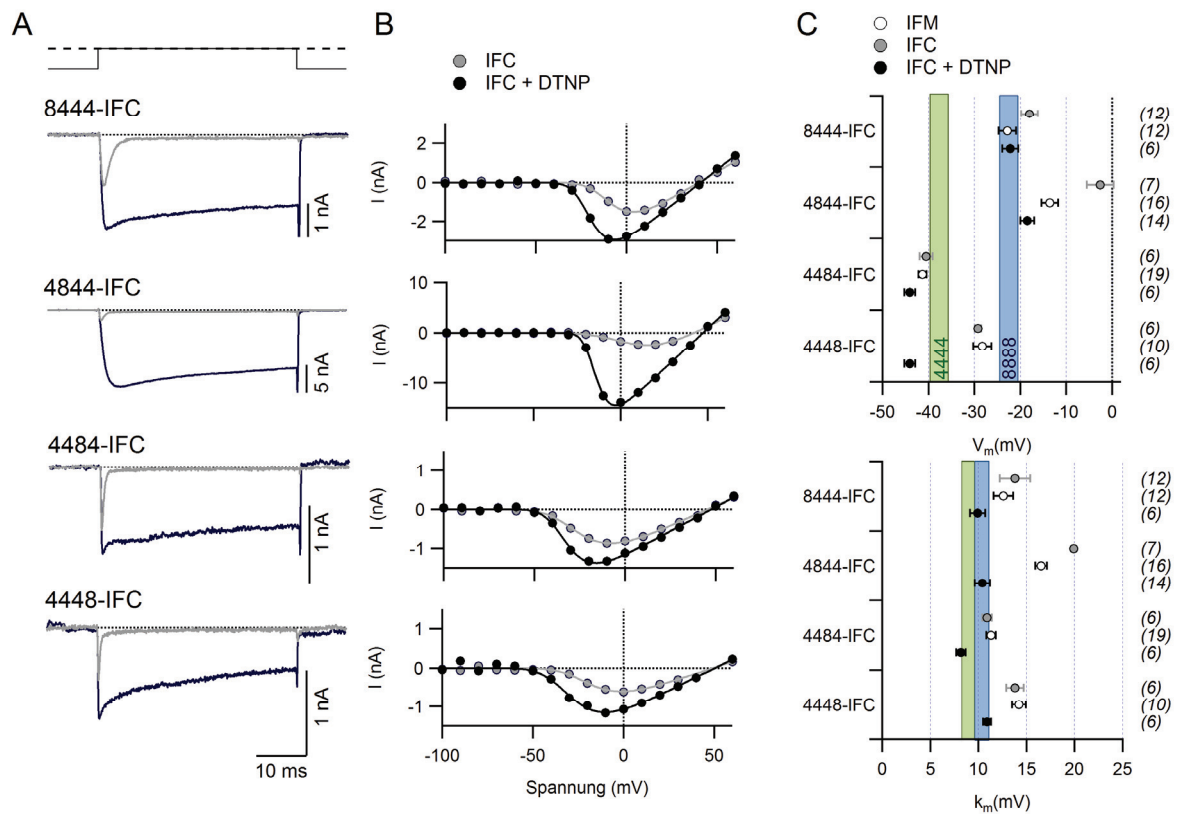


Abb. 3-12 Aktivierungsschaltverhalten von 8444-IFC, 4844-IFC, 4484-IFC und 4448-IFC vor und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung mittels DTNP. **A** Stromantworten auf Spannungspulse von -120 mV auf 0 mV unter Kontrollbedingungen (grau) und unter DTNP (schwarz). Das Pulsprotokoll ist oberhalb der Stromspuren skizziert. **B** Strom-Spannungskennlinien unter Kontrollbedingungen (●) und nach Applikation von DTNP (●) mit Anpassungen nach Gl. (2). **C** V_m (oben) und k_m (unten) vor (●) und nach (●) Applikation von DTNP, sowie zum Vergleich für die IFM-Varianten der Chimären (○).

Die Chimären 4484, 4448 und 4488 zeigen mit Anstiegsfaktoren zwischen 1.3 und 1.8 die geringste Änderung der Stromamplitude, ähnlich wie bei rNav1.4. Bei 8444 und 8844 ist der Anstieg 2.2 ± 0.3 ($n = 6$) bzw. 3.4 ± 0.2 ($n = 5$) und damit deutlich sichtbar und tendenziell wie bei rNav1.8. Die Chimäre der Domäne-2, 4844, hebt sich mit einem Anstieg des Spitzenstromes um den Faktor 9.3 ± 1.3 ($n = 16$) jedoch stark von den übrigen Kanälen ab (Abb. 3-13A). In Abb. 3-13B sind die Aktivierungszeitkonstanten ermittelt durch einfach exponentielles Anpassen der Stromantworten auf -20 mV-Depolarisationen für alle Chimären aufgetragen (wie in Abb. 3-10 ersichtlich, kann bei dieser Spannung mit $m = 1$ gearbeitet werden). Für rNav1.8 und hNav1.8 sind τ_m mit 4.8 ± 1.0 ms ($n = 21$) bzw. 6.1 ± 1.0 ms ($n = 11$) mehr als zehnmals so groß wie bei rNav1.4 (271 ± 63 μ s, $n = 5$). Die Chimären 4484, 4448 und 4488 sind auch in Bezug auf die Aktivierungskinetik mit Zeitkonstanten unter 0.4 ms rNav1.4 sehr ähnlich. Etwas langsamer ist die Aktivierung von 8444 und 8844, jedoch ist $\tau_m < 1$ ms. Die Aktivierung von 4844 ist mit $\tau_m = 3.0 \pm 0.3$ ms dann deutlich langsamer und passt zum außergewöhnlich starken Anstieg des Spitzenstromes bei dieser Chimäre durch Entfernen der Inaktivierung.

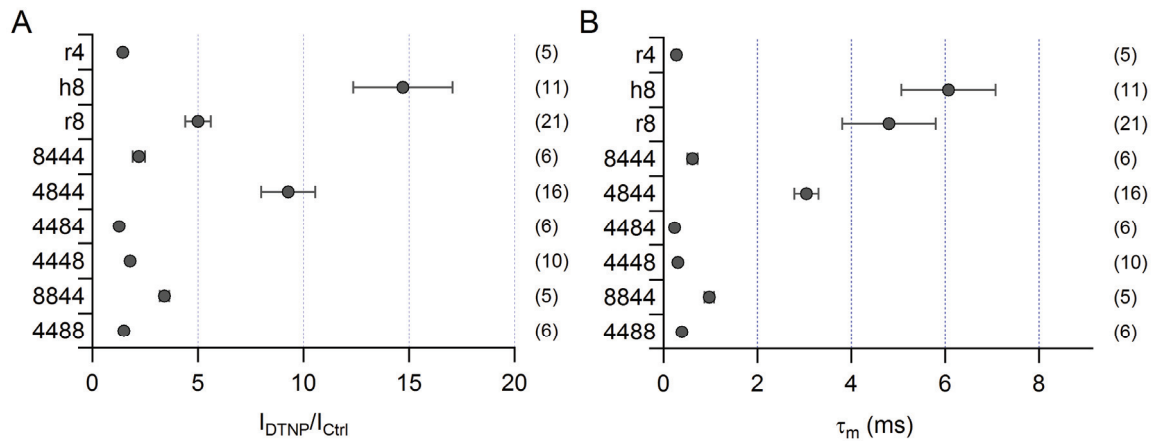


Abb. 3-13 A Entfernen der schnellen Inaktivierung von Na_V -Kanälen bewirkt einen Anstieg des Spitzenstromes. Auftragung des Verhältnisses des Spitzenstromes bei 0 mV nach Applikation von DTNP (I_{DTNP}) zum Spitzenstrom vor Applikation (I_{Ctrl}). **B** Aktivierungszeitkonstanten bestimmt durch einfach exponentielles Anpassen ($m = 1$) der Stromspuren bei -20 mV – Depolarisationen.

Um die Aktivierungskinetik über einen größeren Spannungsbereich zu vergleichen, kann für gute Anpassungsergebnisse der Exponent m als Variable behandelt werden. Die Chimäre 4488 zeichnet sich durch eine sehr schnelle Aktivierungskinetik wie $rNa_V1.4$ aus (Abb. 3-14). Dagegen zeigt 8844 ein Verhalten ähnlich $rNa_V1.8$ bezüglich τ_m und m . Für die Chimäre 4844 erhält man eine starke Übereinstimmung mit $rNa_V1.8$ (Abb. 3-14). Der Exponent m ist für Depolarisationen auf ≤ 30 mV 0.8 ± 0.1 und bei 60 mV 5.3 ± 1.8 ($n = 5$). Die damit ermittelten Zeitkonstanten τ_m liegen zwischen 7.1 ± 3.4 ms (-30 mV) und 176 ± 26 μ s (60 mV). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zu $rNa_V1.8$ (alle $P > 0.1$). Für 8444 werden Aktivierungszeitkonstanten zwischen denen von $rNa_V1.4$ und $rNa_V1.8$ bestimmt (Abb. 3-14).

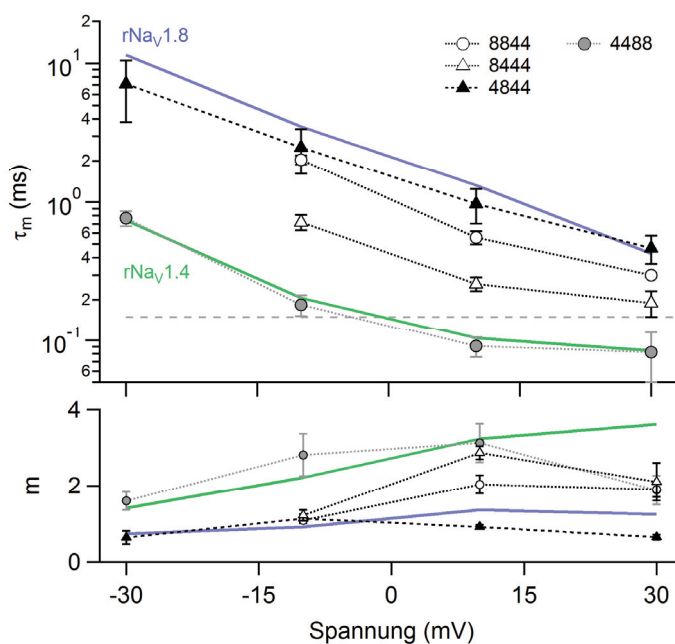


Abb. 3-14 Aktivierungszeitkonstanten (τ_m) und Exponent (m) für die Chimären 8844, 4488, 8444 und 4844 im Vergleich mit $rNa_V1.4$ und $rNa_V1.8$ nach Entfernung der schnellen Inaktivierung. Datenpunkte sind Mittelwerte von je 5-6 Zellen \pm SEM. Die grau gestrichelte Linie markiert die durch den 5 kHz Bessel-Filter realisierbare Zeitaufösung.

Diese Daten zeigen, dass die langsame Aktivierungskinetik nach Entfernung der Inaktivierung und die depolarisierte Aktivierungsspannung hauptsächlich von Domäne-2 von Nav1.8 herrühren. Der Spannungssensor in Domäne-2 von Nav1.8 besitzt zwei KK-Motive in der extrazellulären Schleife zwischen S3 und S4, einzigartig für Nav-Kanäle. KK726 ist dabei vermutlich eher am N-terminalen Ende von S3 lokalisiert und KK747 direkt vor Beginn des S4-Segmentes (Akopian *et al.*, 1996) (Abb. 3-15). Die folgenden Experimente sollen zeigen, ob diese positiv geladenen und großen Aminosäurereste Einfluss auf den Schaltprozess nehmen können.

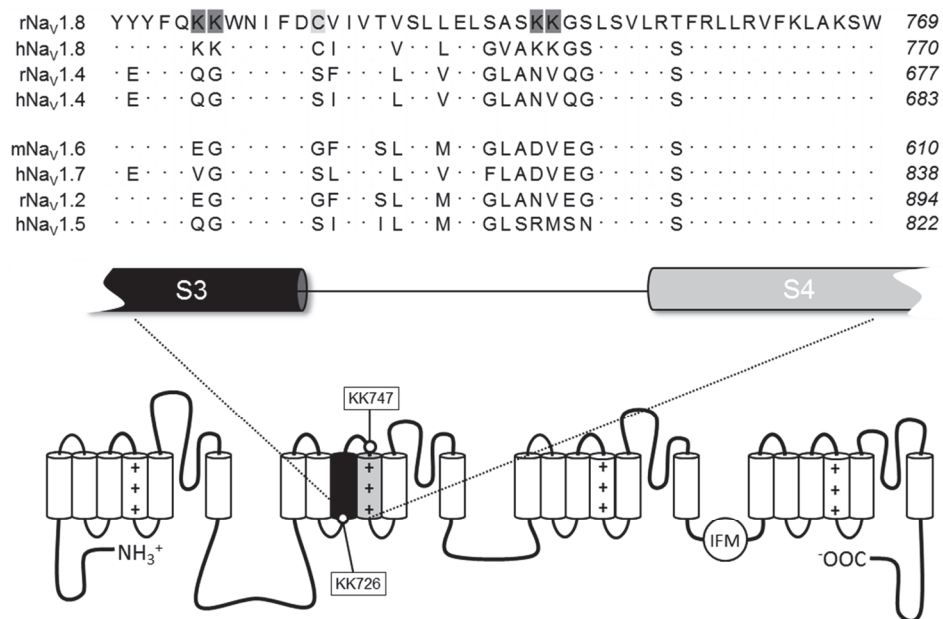


Abb. 3-15 Aminosäuresequenzen einiger Nav-Kanäle im Bereich von S3-S4 in Domäne-2 und Position in der Sekundärstruktur eines Nav-Kanals. Hervorgehoben sind die Doppellysin-Motive KK726 und KK747 in rNav_{1.8}, die eine Besonderheit von Nav_{1.8}-Kanälen sind. Zahlen am Sequenzende geben die Position der letzten gezeigten Aminosäure in der Sequenz an. Punkte symbolisieren bei allen hier gezeigten Nav-Kanälen konservierte Aminosäurereste.

3.2.2.3 rNav_{1.8}-KK726 und KK747 sind am Aktivierungsschaltvorgang beteiligt

Um den Einfluss dieser Aminosäuren auf das Nav-Aktivierungsverhalten bestimmen zu können, wurden folgende Mutationen in rNav_{1.4} und rNav_{1.8} eingebracht, in denen jeweils diese Reste durch die entsprechenden Reste des anderen Kanals ausgetauscht wurden. So entstanden in rNav_{1.8} KK726QG (im Folgenden r8QG), KK747NV (im Folgenden r8NV), sowie die Kombination r8QGNV und in rNav_{1.4} QG634KK-S641C (r4KKC), S641C (r4C), NV655KK (r4KK2), sowie die Kombination r4KKCKK. Im Hintergrund von rNav_{1.8}-IFM bzw. rNav_{1.4}-IFM bewirkt das Entfernen bzw. Einfügen der Lysine deutliche Verschiebungen der Aktivierungsspannungen der Kanäle. Das Lysin-Duplet KK726 in rNav_{1.8}, welches sich vermutlich innerhalb des S3-Segmentes befindet (Abb. 3-15), hat dabei keinen Einfluss. V_m ist bei r8QG mit -8.5 ± 0.9 mV ($n = 10$) nicht von rNav_{1.8} (-10.1 ± 1.3 mV, $n = 34$) verschieden. Bei r8NV ist V_m -15.8 ± 0.8 mV ($n = 14$) und somit um 5.7 mV negativer als bei rNav_{1.8} ($P = 0.0005$) (Abb. 3-16C). Bei der Kombi-

nationsmutante r8QGNV, d.h. der Entfernung beider Lysin-Duplets, ist V_m mit -21.3 ± 0.8 mV ($n = 7$, $P < 10^{-7}$) sogar noch weiter zu negativeren Spannungen und damit in Richtung des V_m von rNav1.4 (-36.0 ± 0.7 mV, $n = 27$) verschoben. Den umgekehrten Effekt hat das Einfügen der Lysine in rNav1.4. Wiederum hat das N-terminale Lysin-Duplett allein (r4KKC) nur einen sehr geringen Effekt auf V_m . V_m der Mutante mit dem C-terminalen Lysin-Duplett, r4KK2, ist jedoch um 7.9 ± 2.2 mV zu stärker depolarisierenden Spannungen verschoben ($n = 10$, $P = 0.0004$). Die Kombination r4KKCKK ist mit $V_m = -23.1 \pm 1.8$ mV ($n = 5$, $P < 0.001$) am deutlichsten in Richtung des rNav1.8-Verhaltens verschoben (Abb. 3-16C). Man findet demnach sowohl qualitativ als auch quantitativ komplementäre Auswirkungen des Einfügens und Entfernens der Lysine auf die halbmaximale Aktivierungsspannung von rNav1.8 und rNav1.4. Die Steigungsfaktoren k_m werden jedoch in rNav1.8 durch Entfernen der Lysine nicht signifikant verändert (alle $P \geq 0.05$) (Abb. 3-16D, Tabelle 1 Anhang). Bei r4KK2 und r4KKCKK ist k_m um 2.5 mV größer als bei rNav1.4 ($P \leq 0.01$), d. h. die Strom-Spannungs-Beziehung verläuft etwas flacher.

Für eine genaue Betrachtung der Aktivierungseigenschaften sind auch alle diese Mutanten zusätzlich im Hintergrund von rNav1.8-IFC bzw. rNav1.4-IFC angefertigt wurden. In Abb. 3-16A, B sind Stromantworten aller Mutanten vor und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung durch Applikation von DTNP gezeigt. Das Entfernen der schnellen Inaktivierung bewirkt bei allen rNav1.8-Mutanten eine Verschiebung von V_m um 11 – 12 mV hin zu negativeren Spannungen, wobei $V_{m, DTNP}$ zwischen rNav1.8 und den Mutanten nicht signifikant verschieden ist (alle $P \geq 0.8$ verglichen mit rNav1.8) (Abb. 3-16C). Die Steigungsfaktoren k_m sind bei allen rNav1.8-Mutanten nach Entfernung der Inaktivierung ~ 8 mV kleiner als unter Kontrollbedingungen (Abb. 3-16D), jedoch ist nur k_m von r8QGNV mit 8.5 ± 0.7 mV ($n = 7$) tendenziell geringer als k_m von rNav1.8-IFC+DTNP (10.1 ± 0.5 mV, $P = 0.1$). Bei den Mutanten r4KKC und r4C sind keine Unterschiede im Verhalten gegenüber dem Wildtypen feststellbar. r4KK2 ($V_m = -32.0 \pm 1.1$ mV, $n = 7$) und r4KKCKK ($V_m = -33.1 \pm 1.9$ mV, $n = 5$) zeigen zu stärker depolarisierenden Spannungen verschobene V_m -Werte, der Unterschied zu rNav1.4 ($V_m = -37.3 \pm 3.3$ mV, $n = 5$) ist jedoch nur schwach ausgeprägt ($P = 0.08$) (Abb. 3-16).

Deutlicher ist der Einfluss der Lysine bei Betrachtung der Änderung der V_m und k_m Werte durch Entfernen der Inaktivierung ersichtlich. Bei rNav1.4 verringert sich V_m um 6.7 ± 0.9 mV und k_m um 1.3 ± 0.5 mV. Hingegen bewirkt das Einfügen der gesamten Domäne-2 von rNav1.8 in rNav1.4 – wie in der Chimäre 4844 – dass eine Verringerung von V_m um 18.0 ± 1.3 mV und von k_m um 11.1 ± 1.5 mV bei Entfernen der Inaktivierung auftritt. Dies entspricht etwa den bei rNav1.8 gemessenen Änderungen von -14.5 ± 1.1 mV bei V_m und -9.9 ± 0.8 mV bei k_m . Allein das

Einbringen der beiden Lysin-Dupletts in rNa_v1.4, r4KKCKK, bewirkt noch Verringerungen von V_m um 10.1 ± 1.7 mV und von k_m um 5.0 ± 0.4 mV.

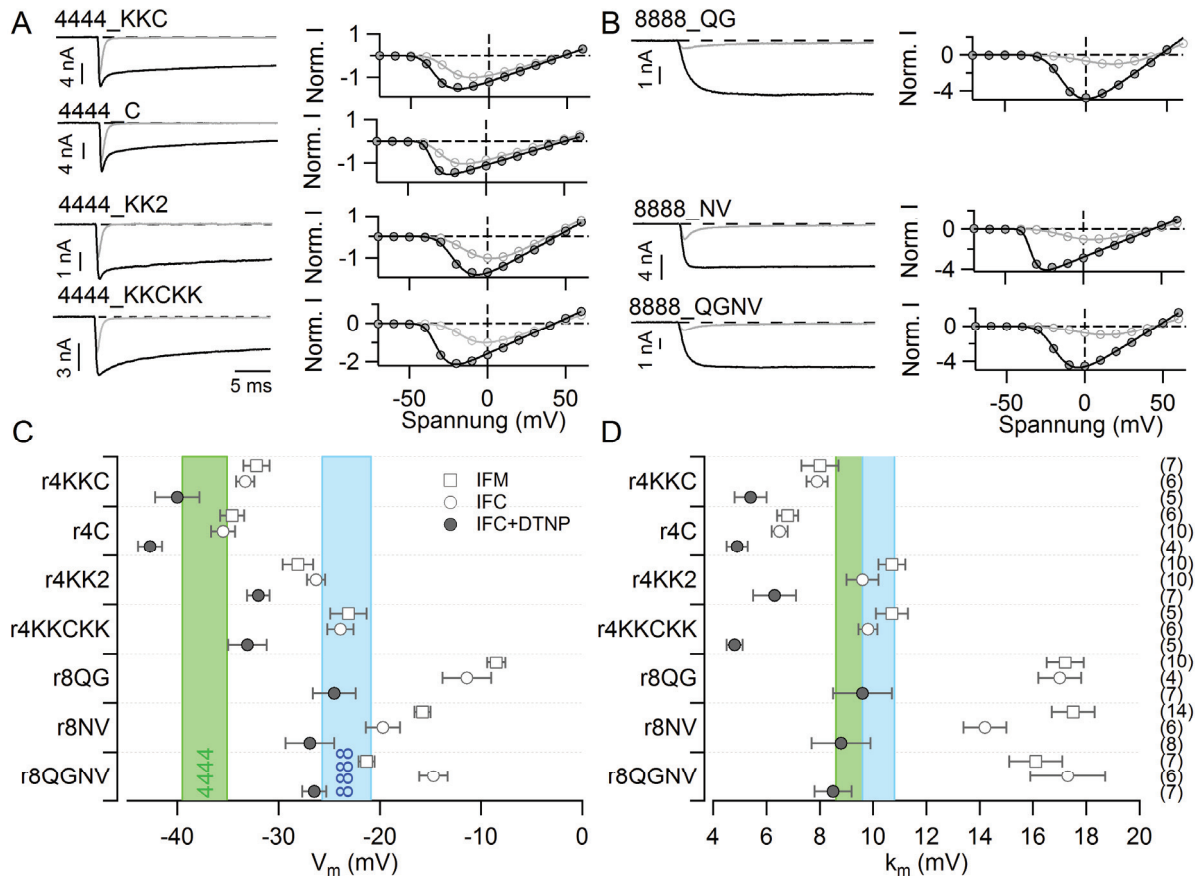


Abb. 3-16 Mutationen in Domäne-2 S354 von rNa_v1.8 und rNa_v1.4 beeinflussen das Aktivierungsverhalten der Kanäle. **A** Stromantworten auf Depolarisationen auf 0 mV für die angegebenen Kanal-Mutanten vor (grau) und nach (schwarz) Entfernung der Inaktivierung mit DTNP. **B** Normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen für die in A gezeigten Kanäle vor (○) und nach (●) Applikation von DTNP. Durchgezogene Kurven sind Anpassungen nach Gl. (2). **C** Halbmaximale Aktivierungsspannungen V_m . **D** Steigungsfaktoren k_m . □ Na_v-IFM, ○ Na_v-IFC vor Applikation von DTNP, ● Na_v-IFC + DTNP, farbige Balken: Na_v1.4-IFC bzw. Na_v1.8-IFC + DTNP.

Im Folgenden wurde durch gezielte Applikation von Substanzen und Neurotoxinen die Funktion einzelner Spannungssensoren modifiziert, um die Rolle von KK726 und KK747 weiter untersuchen zu können.

3.2.3 Direkte Beeinflussung des Aktivierungsvorganges

3.2.3.1 Intrazelluläre Ladungen – Neomycin

Neomycin ist ein polykationisches Aminoglykosid-Antibiotikum welches die Funktion von Na_v-Kanälen beeinflussen kann (Yeiser *et al.*, 2004). Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die negativen Ladungen der Membranphospholipide mit den Na_v1.8-spezifischen Lysinen wechselwirken. Große Kationen wie Neomycin in der Intrazellulärlösung sollten die negativen Ladungen absättigen und somit die Interaktionen von Schaltladungen des Kanals mit

diesen Membranladungen stören, wodurch diese nachgewiesen werden könnten. In Gegenwart von 5 mM Neomycin ist die Aktivierung von rNav_{1.8} zu negativeren Spannungen ($V_m = -25.4 \pm 1.9$ mV) verglichen mit Kontrollbedingungen ($V_m = -10.1 \pm 1.3$ mV) verschoben ($P < 10^{-5}$), bei r8QGNV tritt eine deutlich geringere Verschiebung ($\Delta V_m = -5.7 \pm 3.3$ mV, $P = 0.05$) auf (Abb. 3-17). Die Steigungsfaktoren ändern sich bei beiden Kanälen nicht ($P > 0.5$).

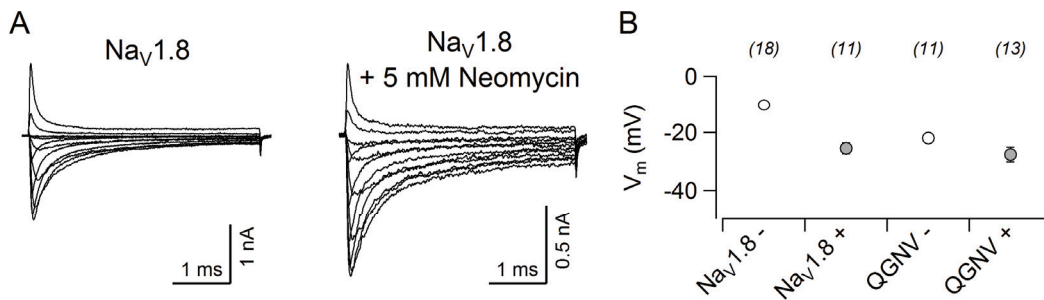


Abb. 3-17 A Stromantworten von rNav_{1.8} exprimiert in Neuro-2A-Zellen ohne (links) und mit 5 mM Neomycin in der Intrazellürlösung (rechts). B V_m unter Kontrollbedingungen (○, -) und in Gegenwart von 5 mM Neomycin (●, +).

Da sich eine Änderung der Anzahl verfügbarer Schaltladungen auf die Steigungsfaktoren k_m auswirken sollte, wurde ein zusätzliches Experiment durchgeführt, um diese zuverlässiger bestimmen können. Es wurden hierzu andere Messlösungen verwendet als bei den übrigen Experimenten, da sich die Steigung der Spannungsabhängigkeit genauer bestimmen lässt, wenn nur Auswärtsströme gemessen werden. Die Intrazellürlösung enthielt in mM: 100 NaF, 30 NaCl, 10 EGTA und 10 Hepes (pH 7.2, CsOH). Die Badlösung enthielt in mM: 150 Cholinchlorid, 2 CaCl₂ und 10 Hepes (pH 7.4, NaOH wodurch sich eine finale Natriumkonzentration von 4 mM ergab). Das errechnete E_{Na} beträgt somit -87 mV und wurde bei den Auswertungen konstant gehalten. Abb. 3-18A zeigt bei diesem Experiment aufgenommene repräsentative Stromspuren von rNav_{1.8}-IFC und r8QGNV-IFC unter verschiedenen Bedingungen: jeweils ohne (-) und mit 5 mM Neomycin (+) in der Intrazellürlösung, sowie vor (schwarz) und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung mit 100 μ M DTNP (blau).

Vergleicht man die Strom-Spannungs-Beziehungen der inaktivierenden Kanäle (Abb. 3-18B oben), so stellt man nur leichte Unterschiede zwischen der Reaktion von rNav_{1.8}-IFC und r8QGNV-IFC auf Neomycin fest. Beide Kanäle zeigen eine Verschiebung von V_m zu negativeren Spannungen: $\Delta V_m = -13.8 \pm 3.3$ mV rNav_{1.8}-IFC ($n = 4$) und -19.2 ± 5.1 mV bei r8QGNV-IFC ($n = 4$). Der Steigungsfaktor k_m verringert sich bei rNav_{1.8}-IFC um 5.1 ± 3.0 mV, bei r8QGNV-IFC ist $\Delta k_m 0.8 \pm 3.6$ mV (Abb. 3-18C).

Deutlicher treten die Differenzen bei Betrachtung der Kanäle nach Entfernung der schnellen Inaktivierung zu Tage (Abb. 3-18B unten). Die Verschiebung von V_m zu negativeren Spannungen

gen in Gegenwart von Neomycin ist bei beiden Kanälen etwa gleich stark ausgeprägt ($\Delta V_m = -18.8 \pm 5.9$ mV rNav1.8-IFC ($n = 3-4$) und -25.2 ± 3.0 mV bei rQGNV-IFC ($n = 3-4$)) (Abb. 3-18C). Die Steigungsfaktoren k_m werden jedoch deutlich verschieden durch Neomycin beeinflusst. Bei rQGNV-IFC ist k_m kaum verändert ($\Delta k_m = 1.0 \pm 2.1$ mV) während bei rNav1.8-IFC k_m um 9.0 ± 1.8 mV reduziert ist in Gegenwart von Neomycin verglichen zu Kontrollbedingungen ($P = 0.013$) (Abb. 3-18C). Dies spricht für eine gegenüber rQGNV bei rNav1.8 stärkere Wechselwirkung mit negativen, auf cytoplasmatischer Seite lokalisierten, Ladungen. Es kann vermutet werden, dass eine solche Interaktion die deaktivierte Konformation des Spannungssensors stabilisiert und eine stärkere Depolarisation für das Öffnen des Kanals erforderlich wird.

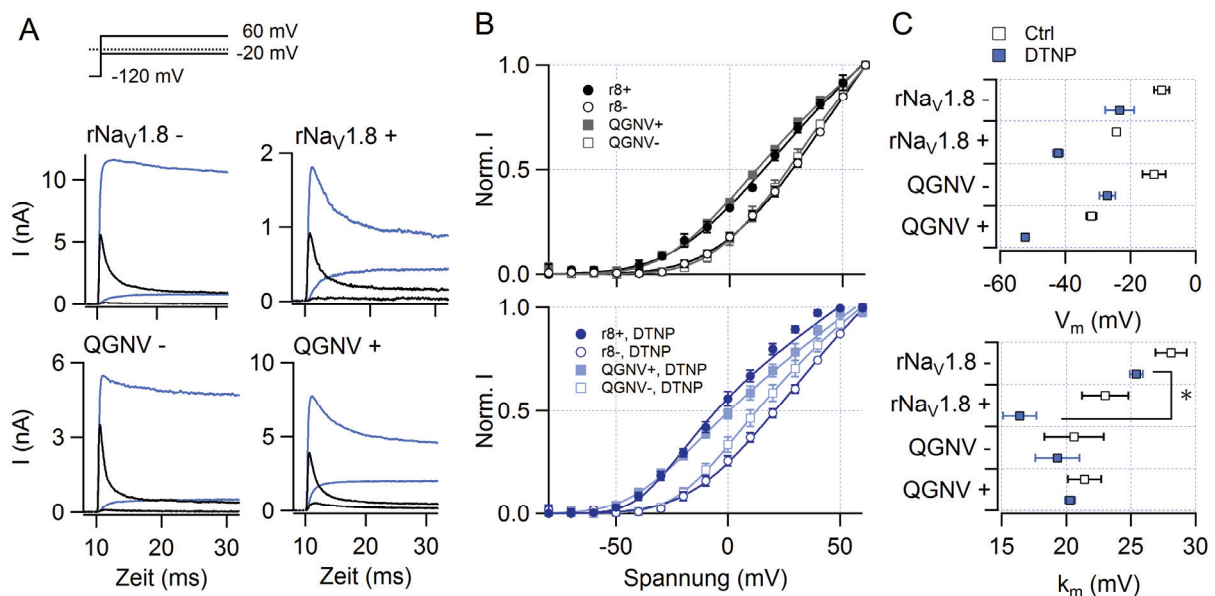


Abb. 3-18 **A** Stromantworten auf Depolarisationen auf -20 mV und 60 mV bei vorhandener Inaktivierung (schwarz) und nach Entfernung der schnellen Inaktivierung durch DTNP (blau) für rNav1.8 und rQGNV ohne (-) und mit (+) 5 mM Neomycin (je $n = 5$). **B** Normalisierte Strom-Spannungs-Beziehungen mit und ohne Neomycin vor Applikation von DTNP (schwarz, oben) und danach (unten). **C** Aktivierungsparameter V_m und k_m . Neomycin bewirkt nur bei rNav1.8 Wildtyp eine deutliche Reduktion des Steigungsfaktors k_m .

3.2.3.2 Spannungssensortoxine μ O-MrVIA und β -Tz1

Um die Bedeutung der Lysin-Dupletts KK726 und KK747 für den Aktivierungsvorgang von rNav1.8 weiter zu untermauern, wurden Spannungssensortoxine eingesetzt. Dazu gehören zum Beispiel μ O-Conotoxine wie MrVIA und Skorpion- β -Toxine wie Tz1. Diese Toxine sind bekannt dafür, ihre Wirkung durch Interferenz mit der Funktionsweise des Spannungssensors von Domäne-2 zu entfalten, indem sie die Aktivierung dieses Sensors behindern (Leipold *et al.*, 2007; Leipold *et al.*, 2012).

Man kennt fünf μ O-Conotoxine (Knapp *et al.*, 2012). Zwei davon sind die aus 31 Aminosäuren bestehenden Toxine MrVIA und MrVIB, welche sich in nur drei Aminosäureresten unterschei-

den. Dabei ist MrVIA etwas potenter in seiner Wirkung gegen rNav_v1.4 als MrVIB (Zorn *et al.*, 2006). In Abb. 3-19 ist die Wirkung von 400 nM MrVIA auf rNav_v1.4, rNav_v1.8 und hNav_v1.8 in Neuro-2A-Zellen in Gegenwart von 300 nM TTX gezeigt. Die Sensitivität von rNav_v1.8 ist mit einem Block von $63.3 \pm 2.1\%$ ($n = 9$) geringer als die von rNav_v1.4-Y401S ($78.3 \pm 2.6\%$, $n = 10$, $P = 0.0003$). Interessanterweise wird die humane Isoform von Nav_v1.8 nur zu $46.5 \pm 2.3\%$ ($n = 5$) geblockt und ist damit signifikant weniger sensitiv als rNav_v1.8 ($P = 0.0003$). Die Zeitkonstanten des Toxineffektes sind bei diesen Kanälen nicht signifikant verschieden (Abb. 3-19). MrVIA hat keinen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.

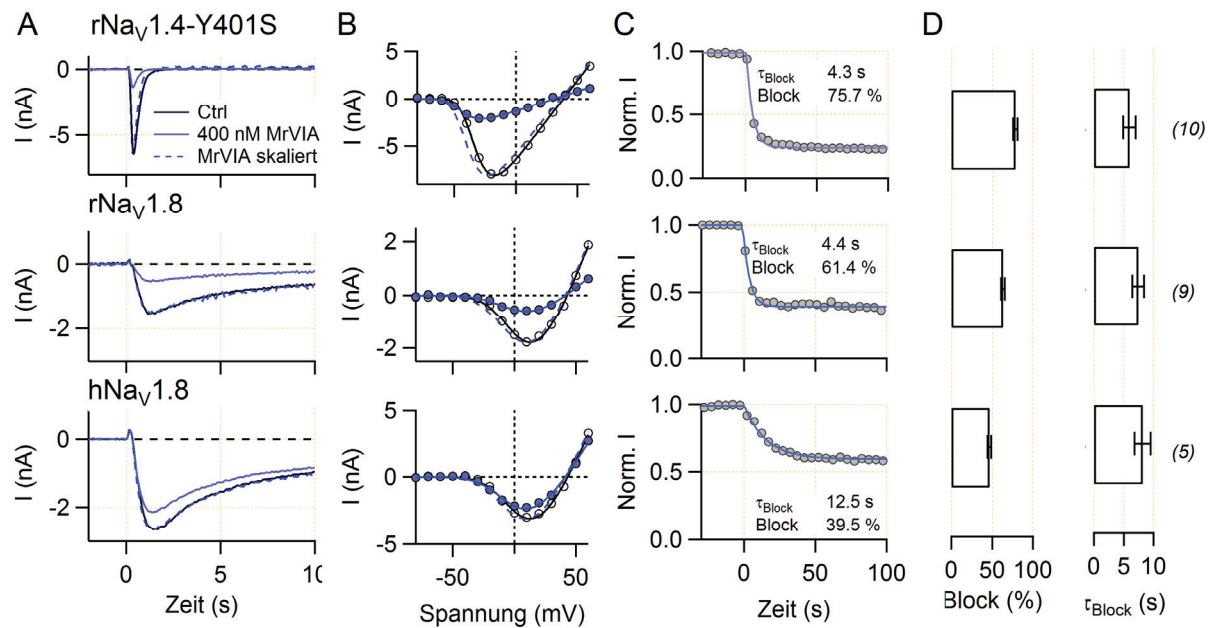


Abb. 3-19 Wirkung von 400 nM MrVIA auf rNav_v1.4, rNav_v1.8 und hNav_v1.8 exprimiert in Neuro-2A-Zellen. **A** Stromspuren nach Depolarisation auf 0 mV vor (schwarz, Ctrl) und nach Applikation von 400 nM MrVIA (blau) von repräsentativen Zellen. **B** Strom-Spannungs-Beziehungen vor (offene Kreise) und nach Toxinapplikation (blaue Kreise) mit Anpassungen nach Gl. (2). **C** Änderung des Spitzenstromes bei 0 mV nach Applikation von 400 nM MrVIA mit einfach-exponentiellen Anpassungen nach Gl. (6). **D** Mittlerer Block und Zeitkonstanten für (n) Zellen.

In Abb. 3-20 ist die Reduktion des Natrium-Spitzenstromes (% Block) bei Applikation von 400 nM MrVIA für r8QG, r8NV und die Kombination r8QGNV vergleichend mit der Wirkung auf rNav_v1.8 und rNav_v1.4-Wildtyp dargestellt. Alle diese Mutanten werden durch 400 nM MrVIA stärker beeinflusst als rNav_v1.8 Wildtyp, dabei spielen die Lysine unterschiedlich starke Rollen. Die Mutante des vorderen Lysin-Dupletts, r8QG, wird etwas stärker inhibiert ($P_{\text{Block}} = 73.8 \pm 5.7\%$, $n = 7$) als rNav_v1.8 ($63.3 \pm 2.1\%$, $n = 9$), allerdings ohne statistische Signifikanz ($P = 0.12$). Deutlich stärker als der Wildtyp wird die Mutante des hinteren Lysin-Dupletts, r8NV, mit einem P_{Block} von $88.6 \pm 1.6\%$ inhibiert ($n = 7$, $P < 10^{-6}$). Die Kombinationsmutante r8QGNV wird am stärksten beeinflusst ($P_{\text{Block}} = 92.9 \pm 1.7\%$, $n = 5$, $P < 10^{-6}$), was für einen additiven Effekt beider Mutationen spricht. Somit werden diese rNav_v1.8-Mutanten sogar stärker inhibiert als rNav_v1.4 ($P_{\text{Block}} = 78.3 \pm 2.6\%$, $n = 10$) (Abb. 3-20).

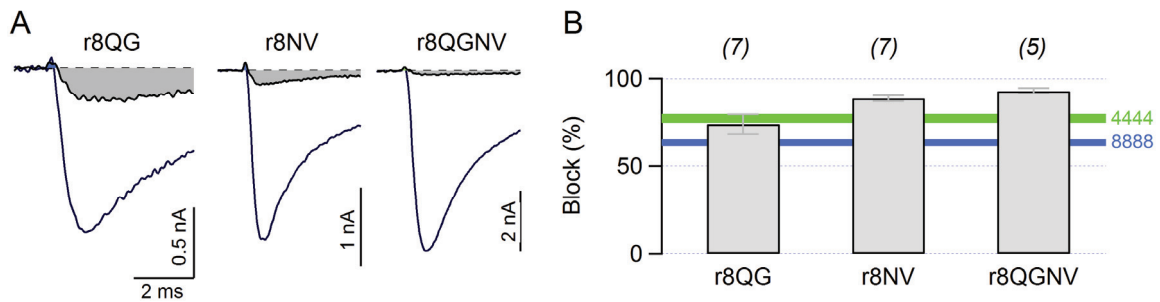


Abb. 3-20 Verstärkung des MrVIA-Blockes durch Entfernen von Lysinen in der Domäne-2 S354 Schleife. **A** Stromantworten auf 0 mV-Depolarisationen vor und nach Applikation von 400 nM MrVIA (ausgefüllte Bereiche). **B** Relative Reduktion des Spitzenstromes bei Applikation von MrVIA.

In Zorn *et al.* (2006) wurde gezeigt, dass die Porenschleife von Domäne-3 die Subtypspezifität von μ O-Conotoxinen zwischen vermittelt. Die in Abb. 3-20 gezeigte erhöhte Sensitivität von r8QGNV gegenüber Nav1.4 könnte eine höhere Affinität der Nav1.8 Porenschleife in Domäne-3 für MrVIA verglichen mit rNav1.4 vermuten lassen. Die Aminosäuresequenzen dieser Region für diese und weitere Natriumkanäle sind in Abb. 3-21A gezeigt. Nicht konservierte Reste sind hervorgehoben. Um die Hypothese der Rolle der Domäne-3 Porenschleife von Nav1.8 abzuklären, wurden Chimären untersucht, die im Hintergrund von Nav1.4 die Porenschleife von hNav1.5 (44(p5)4), mNav1.6 (44(p6)4), hNav1.7 (44(p7)4) und rNav1.8 (44(p8)4) tragen. Abb. 3-21B zeigt die Wirkung von 400 nM MrVIA auf diese Konstrukte nach Expression in HEK293-Zellen. Die Stromamplitude bei 0 mV wird bei 44(p5)4 um $79.0 \pm 6.7\%$ ($n = 4$), bei 44(p6)4 um $51.2 \pm 6.9\%$ ($n = 2$), bei 44(p7)4 um $22.9 \pm 6.1\%$ ($n = 5$) und bei 44(p8)4 um $65.8 \pm 3.2\%$ ($n = 6$) vermindert. Außerdem kann noch 44(p2)4, $19.9 \pm 3.0\%$ ($n = 8$), aus Zorn *et al.* (2006) zum Vergleich herangezogen werden, da diese Messungen mit Toxin aus gleicher Quelle und dem den Chimären zugrunde liegenden rNav1.4 durchgeführt wurde. Es ist demnach möglich, durch Substitution der Domäne-3 Porenschleife die Sensitivität des Kanals gegenüber MrVIA deutlich zu beeinflussen, allerdings ist 44(p8)4 nicht empfindlicher als Nav1.4.

Zur weiteren Eingrenzung der die Sensitivität vermittelnden Reste wurden Punktmutanten verwendet, bei denen die in der Porenschleife nicht konservierten Reste in Nav1.4 zu den entsprechenden Resten aus Nav1.2 mutiert wurden (Leipold *et al.*, 2006). Abb. 3-21C zeigt Stromantworten dieser Mutanten vor und nach Applikation von 400 nM MrVIA, sowie die mittlere Reduktion des Spitzenstromes bei 0 mV. H1257K ist mit einem Block von $79.5 \pm 3.4\%$ ($n = 4$) ebenso sensitiv wie der Wildtyp rNav1.4. Die übrigen Mutanten zeichnen sich durch Sensitivitäten intermediär zwischen rNav1.4 und 44(p2)4 aus. E1251N ($53.8 \pm 3.5\%$, $n = 5$), K1252V ($55.3 \pm 7.2\%$, $n = 3$) und E1254L ($49.8 \pm 7.2\%$, $n = 6$) sind dabei sensitiver als V1260D ($42.2 \pm 5.9\%$, $n = 5$). Dies könnte zum Teil die gegenüber rNav1.8 verminderte Sensitivität von hNav1.8 erklären, da dieser Kanal entsprechen V1260D auch ein D statt V und entsprechend K1252V ein V anstelle eines K besitzt.

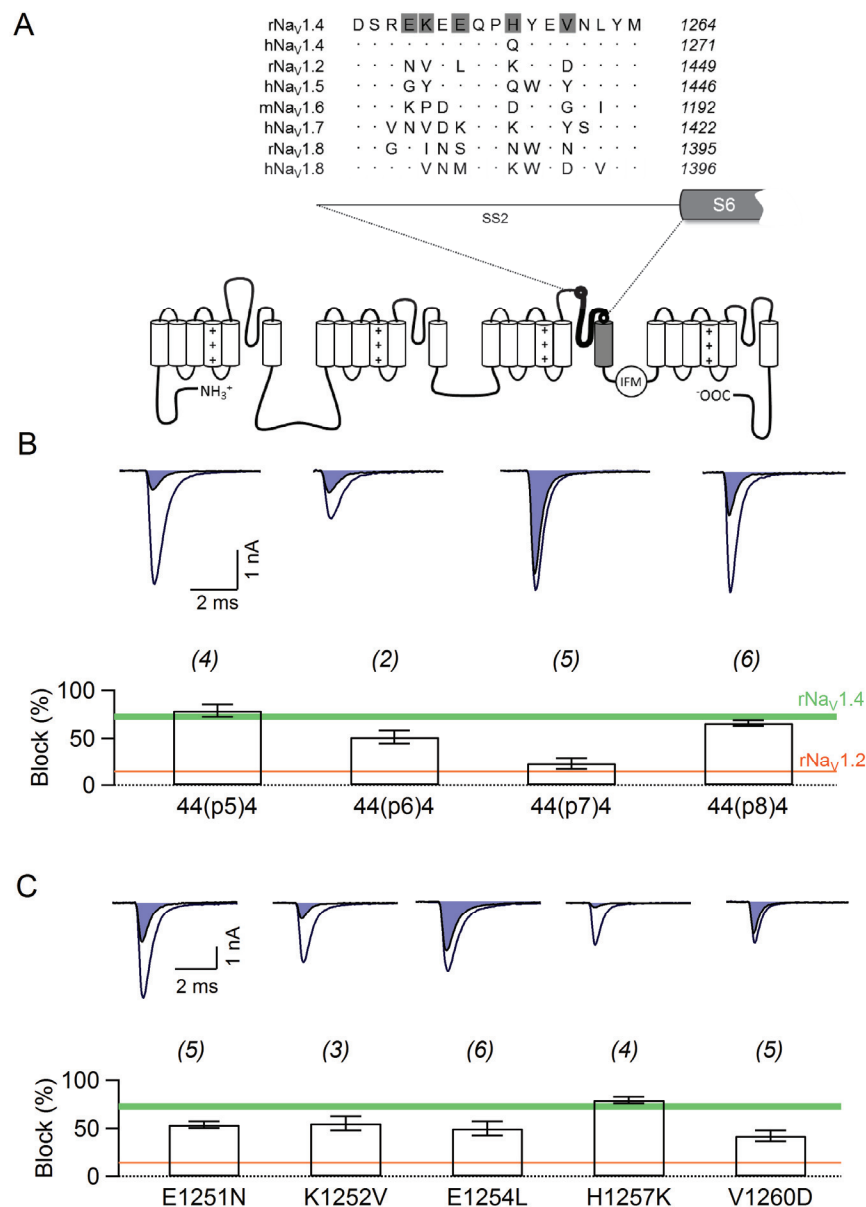


Abb. 3-21 A Schematische Darstellung eines Na_v-Kanals mit Hervorhebung der Porenschleife in Domäne-3 und zugehörige Aminosäuresequenzen. Grau hinterlegt sind die untersuchten Aminosäurepositionen. **B Porenschleifen-Chimären** Stromspuren bei 0 mV-Depolarisationen vor (schwarz) und nach Applikation von 400 nM MrVIA (blau), sowie relative Reduktion des Spitzenstromes für (n) Zellen. **C Porenschleifen-Punktmutanten** Stromspuren bei 0 mV-Depolarisationen vor (schwarz) und nach Applikation von 400 nM MrVIA (blau) und relative Verringerung des Spitzenstromes für (n) Zellen. Gelbe bzw. orange Querbalken markieren die für rNa_v1.4 bzw. rNa_v1.2 (Zorn et al., 2006) ermittelten Werte.

Ebenfalls mit dem Spannungssensor von Domäne-2 von Na_v-Kanälen interagieren Skorpion β -Toxine (Cestele *et al.*, 2001; Leipold *et al.*, 2012). Tz1 verschiebt die Strom-Spannungs-Beziehung von Na_v1.4 (Abb. 3-22): Das Toxin bewirkt eine Amplitudensteigerung bei Depolarisationen, die normalerweise nicht ausreichen, um die Kanäle zu öffnen, sowie eine Reduktion des Spitzenstromes bei stärkeren Depolarisationen (bei 0 mV auf $20 \pm 3\%$, $n = 3$). Bei Na_v1.8 beträgt der Spitzenstrom bei 0 mV nach Applikation von $5 \mu\text{M}$ Tz1 $94 \pm 1\%$ und die Strom-Spannungs-Beziehung ist um $-8.0 \pm 0.3 \text{ mV}$ verschoben ($n = 5$). Eine Erhöhung der

Stromamplitude ist bei keiner Spannung sichtbar. Die Chimäre 4844 zeigt, dass Domäne-2 von $\text{Na}_V1.8$ den Kanal nicht unempfindlich werden lässt. 4844 ist deutlich empfindlicher als $\text{rNa}_V1.8$ – das Spezifitätsepitop für β -Toxine befindet sich in Domäne-3 (Leipold *et al.*, 2006) – und zeigt bei 0 mV einen Reststrom von $27 \pm 6\%$ bei gleichzeitiger Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung zu stärker depolarisierenden Spannungen ($\Delta V_m = 13.8 \pm 3.1$ mV) ($n = 3-5$). Entfernt man das hintere Doppellysin (4844_NV) scheint der Effekt von Tz1 ähnlicher $\text{Na}_V1.4$ zu werden, da die Strom-Spannungs-Beziehung um -4.0 ± 0.6 mV verschoben wird, der Spitzenstrom bei 0 mV beträgt $58 \pm 2\%$ ($n = 5-6$) (Abb. 3-22).

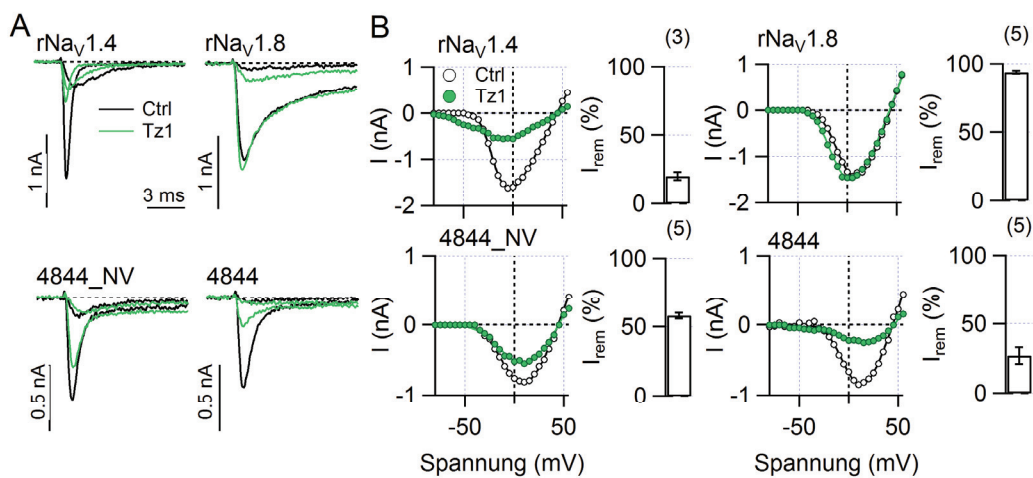


Abb. 3-22 Wirkung von Tz1 auf $\text{Na}_V1.4$, $\text{Na}_V1.8$, 4844 und 4844_NV exprimiert in Neuro-2A Zellen. **A** Stromantworten auf Depolarisationen auf -30 mV und 0 mV vor (schwarz) und nach (grün) Applikation von 5 μM Tz1. **B** Strom-Spannungs-Beziehungen vor (\circ) und nach Applikation von Tz1 (\bullet) mit Anpassungen nach Gl. (2) ($\text{rNa}_V1.4$ mit Anpassung nach Leipold *et al.* (2012)). Balkendiagramme geben den relativen Reststrom bei 0 mV nach Toxinexposition an.

Um die Reaktion der Strom-Spannungs-Beziehungen auf Tz1 detailliert beurteilen zu können, wurde erneut die Inaktivierung der untersuchten Na_V -Kanäle entfernt (Abb. 3-23). Dazu wurden auch in diesem Fall Na_V -IFC Kanäle eingesetzt. Jedoch wurde die Inaktivierung durch intrazelluläre Radikalbildung mittels Lucifer Yellow entfernt (siehe Methoden), um eine Reaktion des Toxins mit reaktiven Gruppen wie DTNP auszuschließen.

Es zeigte sich bei $\text{rNa}_V1.8$ -IFC kein Effekt von Tz1 auf die Strom-Spannungs-Beziehung, aber ein deutlicher Effekt auf die Aktivierungskinetik des Kanals bei Applikation von Tz1. Bei 0 mV beobachtet man etwa eine Verdoppelung der Aktivierungszeitkonstante (Abb. 3-23 A). Bei Mutation des hinteren Doppellysins (r8NV) sind kaum Auswirkungen auf die Aktivierungskinetik bei Toxinapplikation mehr zu beobachten, jedoch verschiebt sich die Strom-Spannungs-Beziehung um -5.3 ± 0.5 mV ($n = 5$).

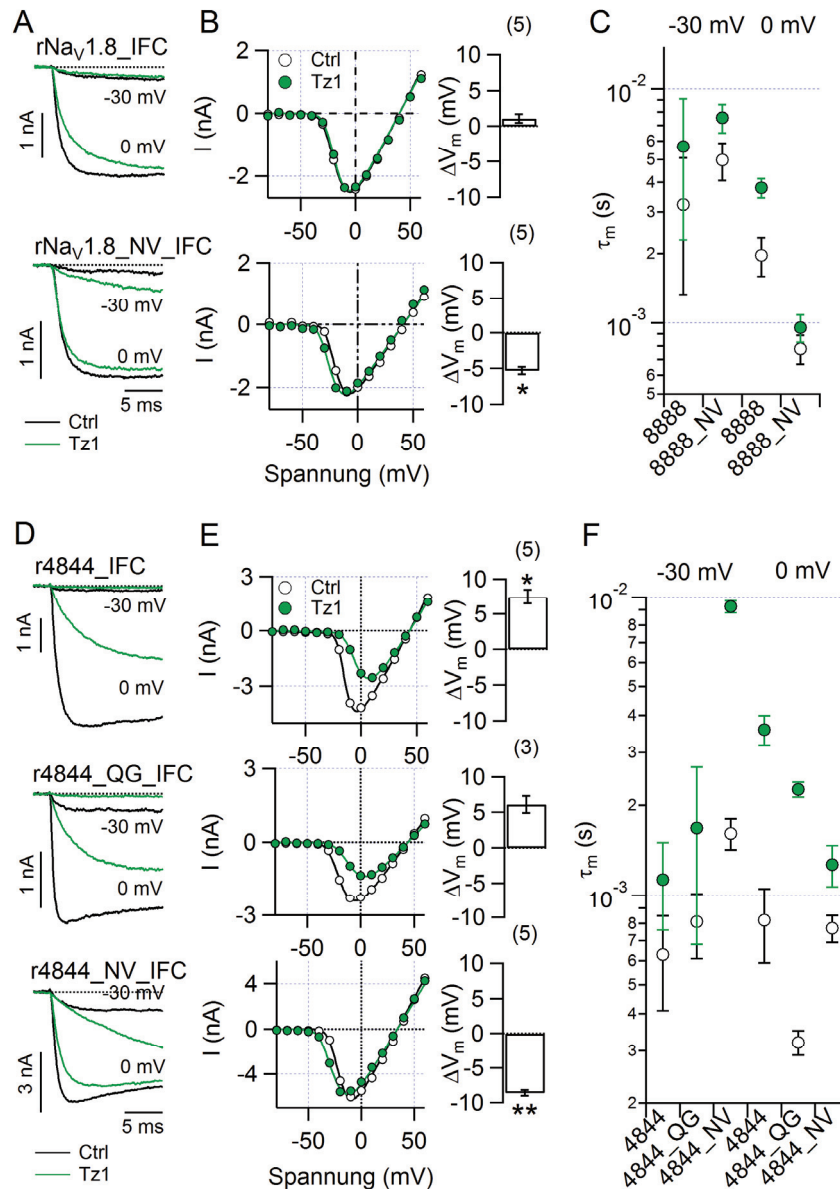


Abb. 3-23 Wirkung von Tz1 auf Na_v-Kanäle nach Entfernung der schnellen Inaktivierung. **A, D** Stromantworten auf Depolarisationen auf -30 mV und 0 mV vor (schwarz) und nach (grün) Applikation von 5 μ M Tz1 für Na_v1.8_IFC (A) und 4844_IFC (D) mit den entsprechenden Lysinmutanten. **B, E** Strom-Spannungs-Beziehungen der Zellen aus A und D und mittlere Verschiebung von V_m bei Toxinexposition (Balken, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$). **C, F** Aktivierungszeitkonstanten τ_m unter Verwendung von $m = 1$ für die angegebenen Kanäle vor (○) und nach Applikation von Tz1 (●) bei -30 mV und 0 mV.

Deutlicher treten die Effekte von Tz1 im Hintergrund der Chimäre 4844 hervor. Bei 4844 wird die halbmaximale Aktivierung um 7.5 ± 1.0 mV ($n = 5$) verschoben, wobei auch die Aktivierung bei 0 mV etwa um den Faktor 4 langsamer wird. Bei Mutation des vorderen Doppellysins (4844_QG) verschiebt sich die halbmaximale Aktivierung unter Tz1 ebenfalls zu stärkeren Depolarisation, um 6.1 ± 1.2 mV ($n = 3$) und τ_m erhöht sich bei 0 mV sogar um den Faktor 7. Bei Entfernung des hinteren Doppellysins (4844_NV) verschiebt Tz1 V_m hingegen um -8.6 ± 0.4 mV ($n = 5$). Bei dieser Mutante ist die Aktivierungskinetik bei -30 mV durch Tz1 stark verlangsamt: τ_m erhöht sich um den Faktor 5.7 ± 0.7 , jedoch nur um etwa das 1.6-fache bei 0 mV (Abb. 3-23).

Trotz der starken Verlangsamung der Aktivierung bei -30 mV erreichen die nicht inaktivierenden 4844_NV-Kanäle unter Tz1 um den Faktor 4.2 ± 0.4 größere Stromamplituden als ohne Toxin. 4844_NV verhält sich somit ähnlicher zu Na_v1.4-IFC (Vgl. mit Leipold *et al.*, 2012) als 4844 bei Applikation von Tz1.

Es zeigt sich hier, dass Mutationen der Doppellysine in Domäne-2 von Na_v1.8 die Wirkung von Spannungssensortoxinen, die mit diesem Sensor wechselwirken, modifizieren. Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung dieser Aminosäuren am Aktivierungsvorgang von Na_v1.8.

3.2.4 Beeinflussung der Kopplung der Schaltprozesse

3.2.4.1 δ -Conotoxine

δ -Conotoxine bewirken einen Verlust der schnellen Inaktivierung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen, indem sie die Aktivierung des Spannungssensors in Domäne-4 behindern (Leipold *et al.*, 2005). Die Applikation von 2 μ M SVIE (aus *Conus striatus*) auf rNa_v1.4 bewirkt, verglichen mit Kontrollbedingungen, einen Anstieg des 5 ms-Inaktivierungsindex um den Faktor 39.8 ± 4.7 ($n = 12$) (im Folgenden als normierter Inaktivierungsindex bezeichnet) mit einer Zeitkonstante τ_{on} von 15.8 ± 2.1 s. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wird dabei um -13.3 ± 1.7 mV zu negativeren Spannungen verschoben; die Gleichgewichtsinaktivierung um -7.4 ± 4.1 mV. Bei rNa_v1.8 hingegen führt die Applikation von 2 μ M SVIE zu keiner messbaren Veränderung des 5 ms-Inaktivierungsindex (norm. $I_{5ms}/I_{max} = 1.0 \pm 0.2$) (Abb. 3-24). Die hier beobachteten leichten Verschiebungen in der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Gleichgewichtsinaktivierung werden bei Na_v1.8 in Abhängigkeit von der Dauer der Messung unabhängig von Applikationen beobachtet.

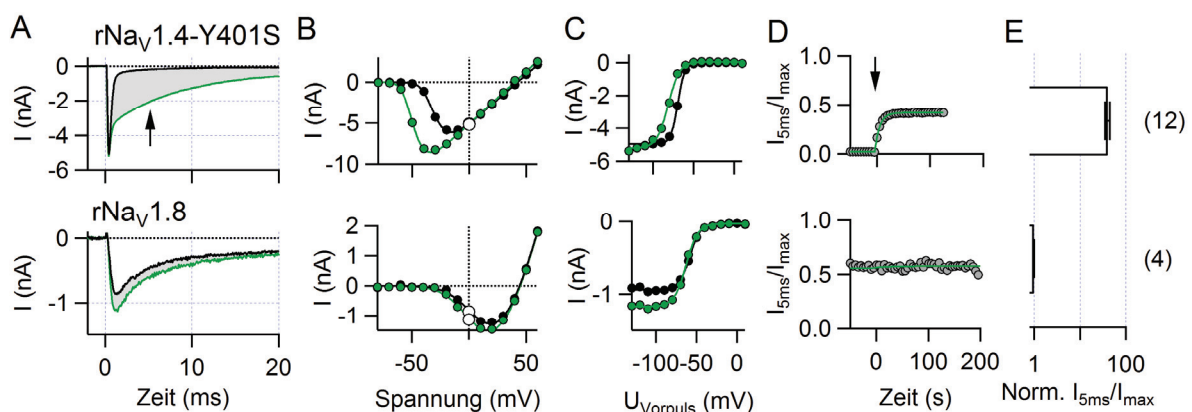


Abb. 3-24 Effekt von δ -SVIE auf rNa_v1.4 und rNa_v1.8. **A** Stromspuren bei Depolarisation auf 0 mV vor (schwarz) und nach Applikation von 2 μ M SVIE (grün). Der Pfeil markiert den Bereich von 5 ms an dem der Inaktivierungsindex bestimmt wurde. **B** Strom-Spannungs-Charakteristik vor (schwarz) und nach SVIE-Applikation (grün). Markiert ist der Punkt bei 0 mV mit den zugehörigen Stromspuren in A. **C** Gleichgewichtsinaktivierung vor und nach SVIE-Applikation. **D** Änderung des 5 ms-Inaktivierungsindex bei Applikation von SVIE ($t = 0$ s, Pfeil). **E** Inaktivierungsverlust als normierter 5 ms-Inaktivierungsindex.

Um den Einfluss einzelner Domänen von Nav1.8 auf die Empfindlichkeit gegenüber SVIE zu untersuchen, wurden Chimären aus Nav1.4 und Nav1.8 (8844, 4488, 8444, 4844, 4484 und 4448) auf ihre Sensitivität gegenüber δ -SVIE getestet. In Abb. 3-25 sind die entsprechenden Stromspuren als Antwort auf 0 mV Pulse vor und im Gleichgewicht nach Applikation von 2 μ M SVIE gezeigt. 4844 ist sehr empfindlich: der normierte Inaktivierungsindex im Gleichgewicht beträgt 13.1 ± 3.1 . In Folge des Inaktivierungsverlustes, verbunden mit einer Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung um -12.8 ± 8.0 mV, steigt der Spitzenstrom bei 0 mV um den Faktor 2.4 ± 0.3 ($n = 5$) an. Außerdem ist zu beachten, dass die Gleichgewichtsinaktivierung dieser Chimäre, im Gegensatz zu rNav1.4, durch SVIE um 6.0 ± 3.5 mV zu positiveren Spannungen verschoben wird.

Interessanterweise zeigen alle übrigen Chimären keine (4448, norm. $I_{5ms}/I_{max} = 0.9 \pm 0.2$) oder nur minimale (8444, 8844, 4484) Änderungen des Inaktivierungsindex nach Kontakt mit SVIE (Abb. 3-26). Der normierte Inaktivierungsindex beträgt bei 8444 2.8 ± 1.0 ($n = 5$), bei 8844 2.2 ± 0.4 ($n = 5$) und bei 4484 3.3 ± 1.0 ($n = 6$) (Abb. 3-25).

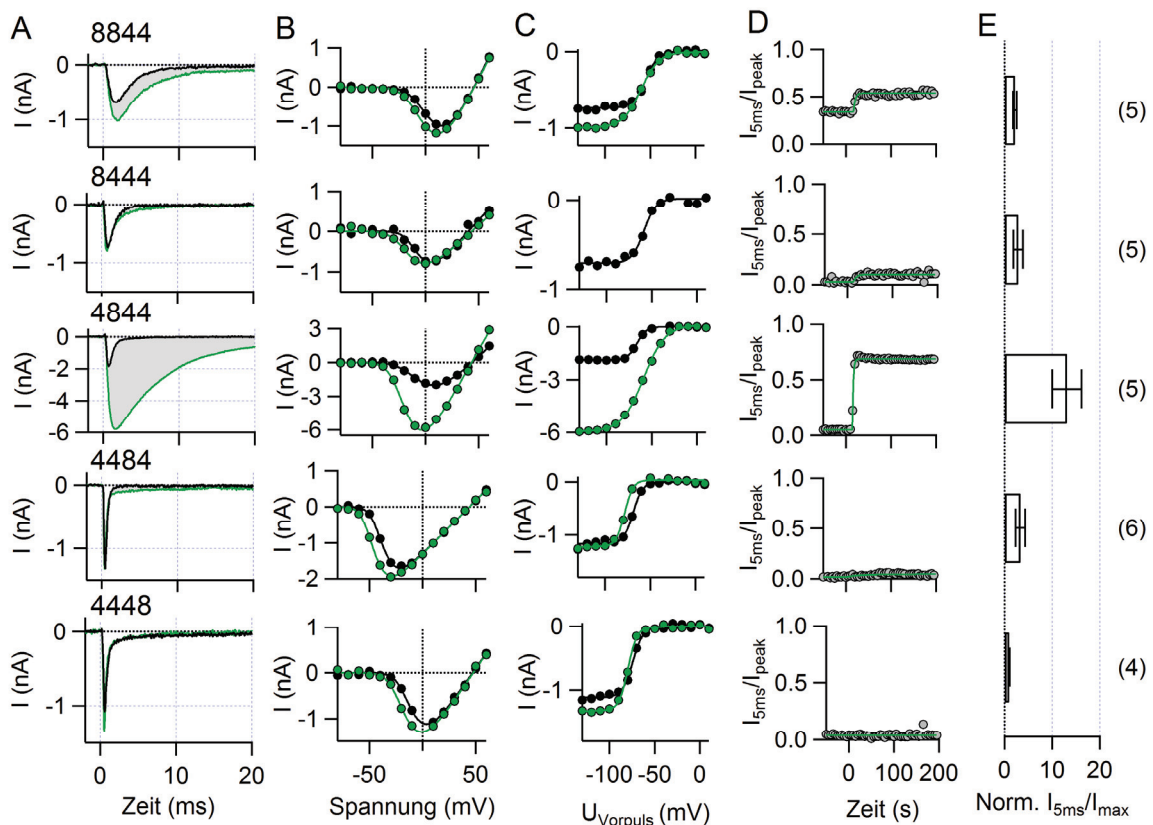


Abb. 3-25 Applikation von δ -SVIE auf rNav1.4/ rNav1.8-Chimären. **A** Stromspuren bei Depolarisation auf 0 mV vor (schwarz) und nach Applikation von 2 μ M SVIE (grün). **B** Strom-Spannungs-Charakteristik vor (schwarz) und nach SVIE-Applikation (grün). **C** Gleichgewichtsinaktivierung. **D** Änderung des 5 ms-Inaktivierungsindex bei Applikation von SVIE ($t = 0$ s). **E** Normierter 5 ms-Inaktivierungsindex.

In Abb. 3-26 ist die Änderung der Inaktivierungszeitkonstanten bei Applikation von SVIE für $rNa_v1.4$ und die Chimäre 4844 dargestellt. Die Verlangsamung der Inaktivierung entsteht demnach aufgrund einer Verdoppelung der langsamen Zeitkonstante τ_{h2} , während die schnelle Komponente (τ_{h1}) nicht durch das Toxin beeinflusst wird. Außerdem nimmt der Anteil der langsamen Komponente an der Gesamt-Inaktivierung bei beiden Kanälen durch SVIE zu. Interessanterweise ist hier bei Verlangsamung der Inaktivierung durch das Toxin keine Vergrößerung der Aktivierungs-Zeitkonstante τ_m bei 4844 zu beobachten. In Folge des Inaktivierungsverlustes steigt die Stromamplitude bei dieser Chimäre in diesem Experiment deutlich an, im Mittel um den Faktor 2.4 ± 0.3 ($n = 5$). Dies scheint somit hauptsächlich durch die Links-Verschiebung der Strom-Spannungs-Beziehung um -12.8 ± 8.0 mV ($n = 5$) bedingt zu sein.

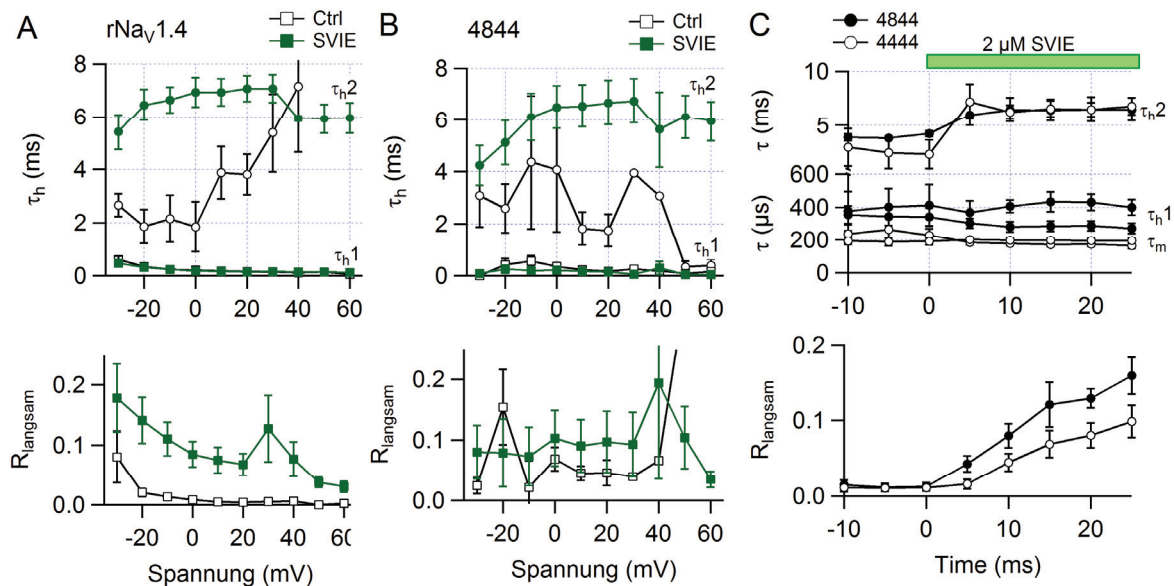


Abb. 3-26 SVIE beeinflusst die langsame Komponente der schnellen Inaktivierung. **A, B** Langsame (τ_{h2} , Kreise) und schnelle (τ_{h1} , Quadrate) Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung von $rNa_v1.4$ bzw. 4844 vor (schwarz) und nach Applikation von 2 μ M SVIE (grün)(oben). Der Anteil der langsamen Komponente an der Gesamt-Amplitude ist über den gesamten Spannungsbereich größer nach Applikation von SVIE (unten). **C** Änderung der Inaktivierungszeitkonstanten bei 0 mV und Anteil der langsamen Komponente (unten).

Als Interaktionsstelle von δ -SVIE mit dem Na^v-Kanal nimmt man einen Bereich im extrazellulären S3-S4 Verbindungsstück der Domäne-4 an (Leipold *et al.*, 2005; Heinemann & Leipold, 2007). Dort befindet sich bei allen Na^v-Kanälen außer Na^v1.8 eine hydrophobe Tripeptidsequenz, bestehend aus den Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Valin (YFV, Abb. 3-27). Bei Na^v1.8-Kanälen liegt nur ein FV-Motiv vor, zudem ist das S3-S4 Verbindungsstück hier um drei Aminosäurereste länger als bei Na^v1.4. Auf diesen Beobachtungen aufbauend wurden zwei zusätzliche Mutationen in der Chimäre 4448 eingefügt, um zu prüfen, ob sich so die Empfindlichkeit gegenüber SVIE erhöhen lässt. Zum einen wurde ein Valin eingefügt, um eine YFV-Sequenz zu erzeugen: 4448+V. Diese Mutante ist ebenso unempfindlich wie 4448. Des Weiteren

ren wurden zwei Aminosäurereste entfernt, 4448-EN, um den Linker zu verkürzen und eine ähnliche hydrophobe Triade (LYF) wie in Nav1.4 zu erhalten (Abb. 3-27). Jedoch ändert sich auch bei dieser Mutante bei Applikation von 2 μ M SVIE der Inaktivierungsindex nicht (norm. $I_{5\text{ms}}/I_{\text{max}} = 1.3 \pm 0.1$, $n = 5$). Überraschend ist die geringe Empfindlichkeit von 4484 gegenüber SVIE. Aufgrund der Vermutung einer Beteiligung der Porenschleife der Domäne-3 wurde die Porenschleifenchimäre 44(p8)4 untersucht. Der normierte Inaktivierungsindex beträgt 19.0 ± 4.4 ($n = 4$) und somit weniger als bei Nav1.4 (Abb. 3-27). Jedoch ist die durch SVIE induzierte Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung mit -12.9 ± 5.2 mV und der Gleichgewichtsaktivierung mit -11.9 ± 0.5 mV ähnlich wie bzw. sogar stärker als bei Nav1.4. Eine Auflistung aller bestimmten Parameter befindet sich in Tabelle 5 im Anhang.

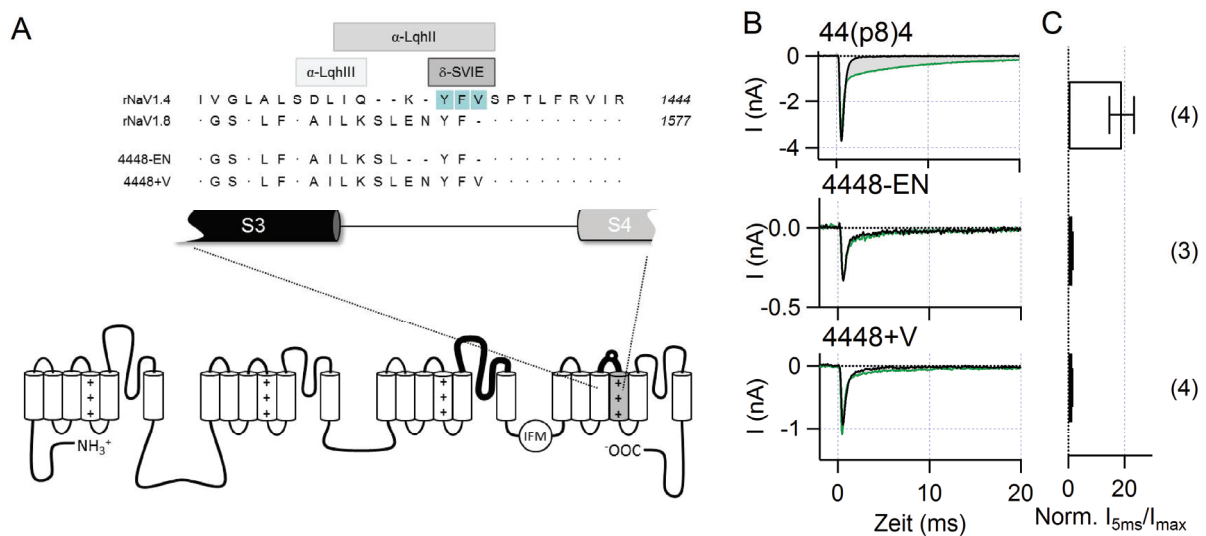


Abb. 3-27 **A** Aminosäuresequenzen von rNav1.4 und rNav1.8 sowie der Mutanten 4448-EN und 4448+V in der D4 S3S4 Schleife mit Hervorhebung der SVIE-Rezeptorsequenz „YFV“ und Markierung der Interaktionsstellen von δ -SVIE, sowie den Skorpion α -Toxinen α -Lqh2 und α -Lqh3, welche ebenfalls einen Inaktivierungsverlust bei Nav-Kanälen bewirken. **B** Stromspuren bei 0 mV vor (schwarz) und nach Applikation von 2 μ M SVIE (grün). **C** Normierter 5 ms-Inaktivierungsindex.

3.2.4.2 Skorpion α -Toxine

Skorpion α -Toxine sind den δ -Conotoxinen strukturell nicht ähnlich, haben aber eine ähnliche Wirkung auf spannungsabhängige Natriumkanäle. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von α -Lqh2 auf Nav1.8 untersucht. Es ist bekannt, dass der Nav1.8 Wildtyp unempfindlich gegenüber dem Gift des Skorpions *Leiurus quinquestriatus hebraeus* ist (Saab *et al.*, 2002). Wird eine Sequenz von vier Aminosäureresten in das S3-S4 Verbindungspeptid von Domäne-4 bei Nav1.4 eingefügt (SLEN, vergleiche Abb. 3-27), wird der Kanal ebenfalls unempfindlich gegenüber dem Toxin LQTX des Skorpion-Gifts (Saab *et al.*, 2002).

Abb. 3-28 zeigt den Effekt von 20 nM α -Lqh2 auf den rNa_v1.4 Wildtyp exprimiert in ND7/23-Zellen. Ähnlich der Wirkung von 2 μ M SVIE auf Na_v1.4 beträgt der normierte Inaktivierungsindex nach Applikation von Lqh2 38.5 ± 5.2 ($n = 7$). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung wird um 13.5 ± 1.2 mV zu negativeren Spannungen verschoben. Die Gleichgewichtsinaktivierung wird jedoch nicht beeinflusst.

Die Chimäre 4488 (Abb. 3-28) zeigt keine Änderung der schnellen Inaktivierung bei Kontakt mit Lqh2 (norm. $I_{5\text{ms}}/I_{\text{max}} = 1.0 \pm 0.1$, $n = 3$). Auch in der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Gleichgewichtsinaktivierung sind keine Unterschiede festzustellen. Jedoch scheint, wie bei SVIE beobachtet, die vordere Hälfte des Na_v1.8-Kanals auch die Wirkung von Lqh2 zu beeinflussen. Die Chimäre 8844 zeigt eine gegenüber Na_v1.4 deutlich reduzierte Empfindlichkeit (norm. $I_{5\text{ms}}/I_{\text{max}} = 3.4 \pm 0.7$, $n = 5$), ist jedoch nicht vollständig unempfindlich. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ist um -7.2 ± 1.6 mV verschoben, die der Gleichgewichtsinaktivierung allerdings um 5.3 ± 1.6 mV zu positiveren Spannungen, ähnlich wie bei 4844 für SVIE beobachtet (Abb. 3-28). Einfügen der Domäne-1 aus Na_v1.8 in Na_v1.4 ist ausreichend, um die Empfindlichkeit gegenüber Lqh2 deutlich zu vermindern. Bei 8444 beträgt der normierte $I_{5\text{ms}}/I_{\text{max}}$ 2.7 ± 0.4 ($n = 6$) (Abb. 3-28).

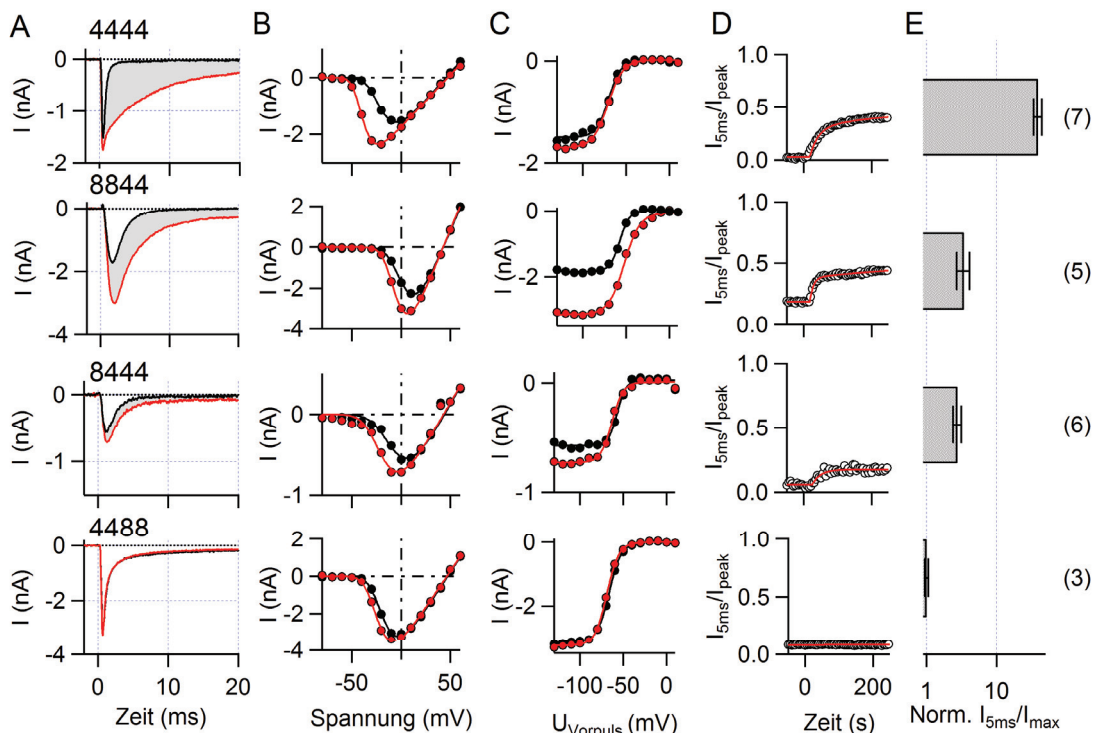


Abb. 3-28 Applikation von α -Lqh2 auf rNa_v1.4/rNa_v1.8-Chimären exprimiert in ND7/23-Zellen. **A** Stromspuren bei Depolarisation auf 0. **B** Strom-Spannungs-Charakteristik. **C** Gleichgewichtsinaktivierung vor (schwarz) und nach Lqh2-Applikation (rot). **D** Änderung des 5 ms-Inaktivierungsindex bei Applikation von Lqh2 ($t = 0$ s). **E** Normierter 5 ms-Inaktivierungsindex.

Wie ein Vergleich der Wirkung von SVIE und Lqh2 zeigt, bestehen deutliche Parallelen zwischen der Empfindlichkeit der getesteten Chimären bezogen auf diese beiden Toxine. Nav1.8 ist gegenüber beiden Toxinen unempfindlich. Dies wird jedoch nicht wie angenommen ausschließlich durch S354 in Domäne-4 vermittelt, sondern zusätzlich unter Beteiligung der Domänen-1 und 3.

Die hier präsentierten Daten belegen die Rolle von Domäne-2 und eine Beteiligung von KK726 und KK747 am Aktivierungsvorgang von Nav1.8. Zudem wurden einige molekulare Hintergründe pharmakologischer Eigenschaften des Kanals beschrieben. Thema der folgenden Abschnitte sind Experimente zu Mechanismen der zellulären Regulation von Nav1.8-Kanälen.

3.3 Oxidationssensitivität von Nav1.8

3.3.1 Beeinflussung von Nav1.4 und Nav1.8 durch Chloramin-T

Bei Applikation von oxidierenden Substanzen wie Chloramin-T zeigt sich, dass Nav1.8 verglichen mit anderen Nav-Kanälen außerordentlich sensitiv auf Oxidation reagiert. In Abb. 3-29 sind Stromantworten von humanem Nav1.8 vor und 500 s nach Applikationsbeginn von 10 μ M Chloramin-T (ChT) im Vergleich zu rNav1.4 gezeigt.

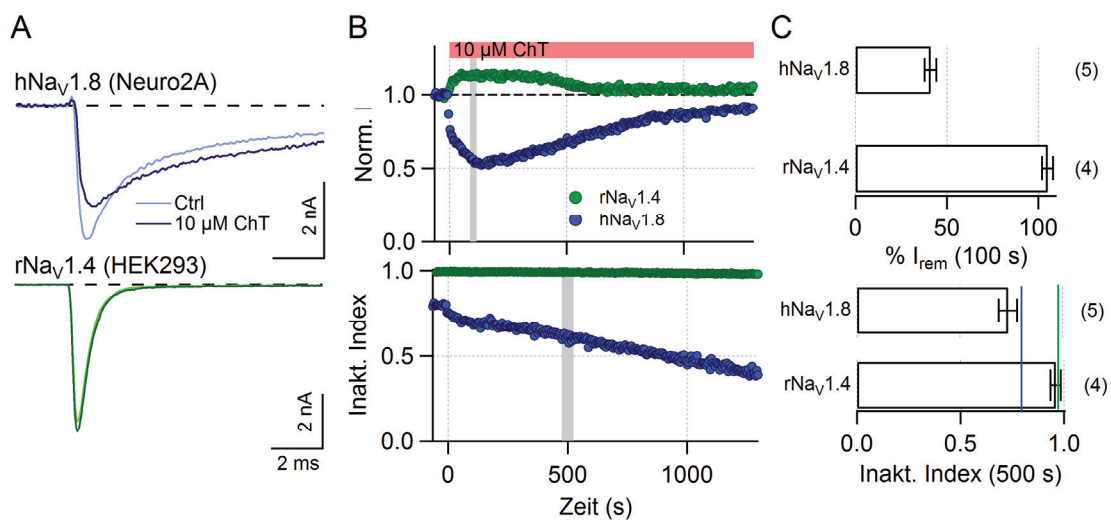


Abb. 3-29 Wirkung von Chloramin-T auf hNav1.8 und rNav1.4 Kanäle. **A** Stromantworten auf Depolarisationen auf 0 mV von hNav1.8 exprimiert in Neuro-2A-Zellen (oben) bzw. rNav1.4 exprimiert in HEK293-Zellen (unten) vor (Ctrl, hell) und nach 500 s Applikation von 10 μ M Chloramin-T (ChT) (dunkel). **B** Verlauf des normalisierten Einwärtsstromes (oben) und Verlauf des Inaktivierungsindex (unten) bei 0 mV für rNav1.4 (grün) und hNav1.8 (blau) nach Beginn der Applikation von 10 μ M ChT bei t = 0 s. Senkrechte graue Balken markieren den Zeitpunkt der Auswertung in C. **C** Relativer verbleibender Strom nach 100 s (oben) sowie Inaktivierungsindex nach 500 s Applikationsdauer (unten). Der mittlere Inaktivierungsindex vor Beginn der Applikation ist jeweils als gestrichelte Linie angegeben (grün – rNav1.4, blau – hNav1.8).

ChT beeinflusst sowohl die Stromamplitude als auch den Inaktivierungsindex. Letzterer wird bestimmt durch das Verhältnis des Stromes nach 10 ± 1 ms zum Spitzenstrom ($r = I_{10\text{ms}}/I_{\text{peak}}$) und als Differenz $1-r$ aufgetragen. Bei rNav1.4 misst man kurz nach Beginn der Applikation von $10 \mu\text{M}$ ChT einen leichten Anstieg des Spitzenstromes auf $104.9 \pm 3.2\%$ ($n = 4$) innerhalb der ersten Sekunden und selbst nach > 1000 s Applikationsdauer nahezu keine Änderung des Inaktivierungsindex (Abb. 3-29B, C). Bei hNav1.8 hingegen erfolgt zunächst eine starke Reduktion des Spitzenstromes innerhalb der ersten 200 s auf $41.0 \pm 3.3\%$ ($n = 5$) der ursprünglichen Stromamplitude. Der Inaktivierungsindex verringert sich ebenfalls sofort mit Beginn der Applikation von 0.851 ± 0.024 ($n = 5$) bis auf 0.734 ± 0.044 nach 500 s. Bei weiterem Verlust der Inaktivierung steigt der Spitzenstrom wieder an (Abb. 3-29).

Als untersuchenswert stellen sich demnach zwei Beobachtungen dar. Zum einen der Inaktivierungsverlust, welcher bei Nav1.8 bei extrem niedrigen Konzentrationen von ChT beobachtet werden kann. Zum Vergleich werden entsprechende Änderungen des Inaktivierungsindex bei rNav1.4 erst ab Konzentrationen von mehr als $100 \mu\text{M}$ erzielt (Kassmann *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite steht die anfängliche Reduktion des Spitzenstromes, welche ansonsten nur bei hNav1.5 beschrieben wurde. Dort ist die Ursache aber hauptsächlich der Oxidation von C373 in der Porenschleife der Domäne-1 zuzuordnen, dem Rest, der auch die Resistenz gegen TTX bei diesem Kanal vermittelt (Kassmann *et al.*, 2008). Die Anfangsbeobachtungen bei Nav1.8 lassen aufgrund des sequentiellen Auftretens von Stromreduktion und Stromzunahme bei geringen oxidativen Stimuli auf ein hohes Regulationspotential von Nav1.8 durch Oxidation schließen.

3.3.2 rNav1.8_IFM und IFL unter Chloramin-T

Um die molekularen Hintergründe dieser beiden Beobachtungen näher einzugrenzen, kann zunächst auf die Nav1.4/Nav1.8-Chimären zurückgegriffen werden. Da diese auf Basis von Nav1.8 der Ratte entstanden sind, wurde im Folgenden zunächst der Effekt von $10 \mu\text{M}$ ChT auf rNav1.8 untersucht. Dabei werden sowohl der Wildtyp rNav1.8_IFM als auch die Mutante rNav1.8_IFL betrachtet. rNav1.8_IFL besitzt im Inaktivierungsmotiv anstelle des Methionins einen nicht oxidierbaren Leucin-Rest. Stromantworten dieser beiden Kanäle und Strom-Spannungs-Beziehungen sind in Abb. 3-32A, B vor (grau) und 500 s nach Beginn der Exposition mit $10 \mu\text{M}$ ChT (schwarz) gezeigt. Bei Wildtyp und Mutante hat ChT Einfluss auf die Stromamplitude und die Inaktivierungskinetik. Die Reduktion des maximalen Einwärtsstromes bei Depolarisation auf 0 mV erfolgt bei rNav1.8_IFM bis auf $62.2 \pm 0.6\%$ und bei rNav1.8_IFL $64.5 \pm 0.6\%$ (Abb. 3-30C, D). Die Applikationsdauer bis zum Erreichen dieses Blockes ist bei rNav1.8_IFL mit $\tau_{\text{Block}} 159 \pm 5$ s aber deutlich länger als bei rNav1.8_IFM ($\tau_{\text{Block}} 56 \pm 2$ s) (Abb. 3-30C, D). Unter Kontrollbedingungen ist die Inaktivierung von IFL (Index 0.770 ± 0.020) etwas

weniger vollständig als die von IFM (0.859 ± 0.015). Der Inaktivierungsindex reagiert auch bei rNav1.8_IFL auf Oxidation, jedoch schwächer als bei rNav1.8_IFM und es wird eine Sättigung des Effektes nach ca. 200 s Applikationsdauer bei 0.711 ± 0.022 erreicht. Der Inaktivierungsindex von IFM beträgt nach 500 s Applikationsdauer 0.750 ± 0.034 (Abb. 3-30E, F). Normiert auf den jeweiligen Inaktivierungsindex vor der Applikation ist IFM mit $\text{Idx}_{\text{norm}} = 0.874 \pm 0.042$ stärker beeinflusst als IFL mit $\text{Idx}_{\text{norm}} = 0.924 \pm 0.037$.

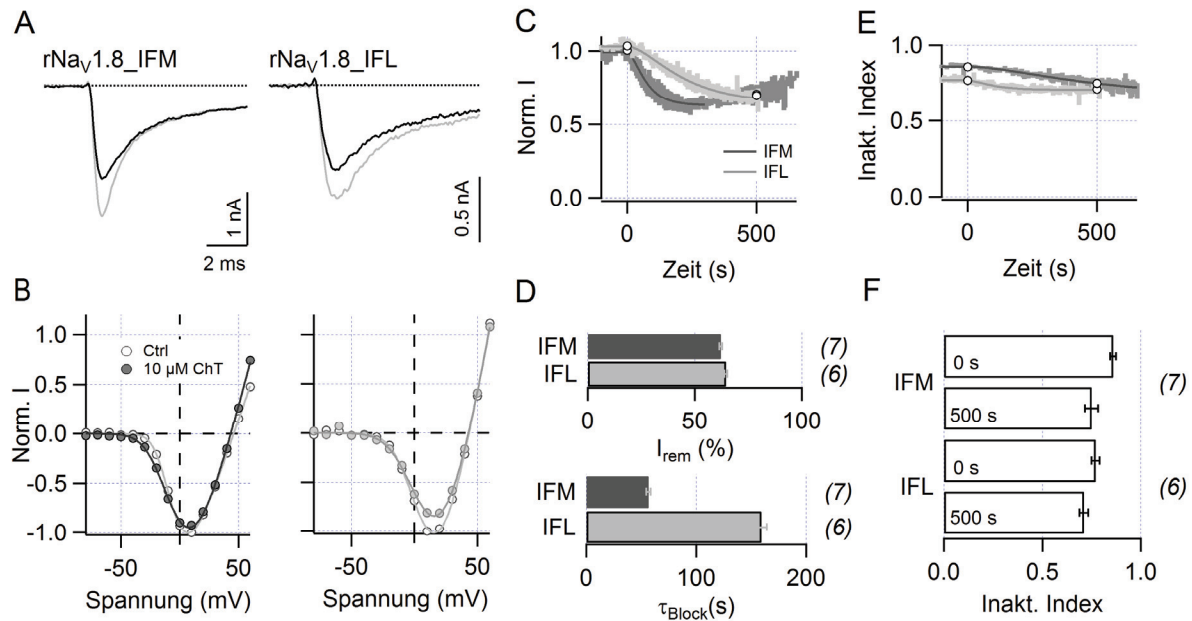


Abb. 3-30 **A** Stromantworten auf Depolarisationen auf 0 mV von rNav1.8_IFM und rNav1.8_IFL vor (grau) und nach Applikation von 10 µM ChT für 500 s (schwarz). **B** Auf den Spitzenstrom bei 0 mV normalisierte Strom-Spannungs-Kennlinien von repräsentativen Zellen von rNav1.8_IFM und rNav1.8_IFL vor (○) und nach Applikation von 10 µM ChT (●) mit Anpassungen nach Gl. (2). **C** Verlauf des normalisierten Einwärtsstromes und **D** Verlauf des Inaktivierungsindex ($1 - I_{10\text{ms}} / I_{\text{max}}$) bei 0 mV für rNav1.8_IFM (dunkelgrau) und rNav1.8_IFL (hellgrau) nach Beginn der Applikation von 10 µM ChT bei $t = 0$. Die Punkte markieren die Zeitpunkte entsprechend den Stromspuren in A und der Analyse in F (Anpassungen nach Gl. (8)). **E** Mittlerer maximal erreichter Block. **F** Inaktivierungsindex vor (0 s) und nach 500 s Applikationsdauer.

Die Änderung des Inaktivierungsmotivs IFM zum weniger oxidationsempfindlichen IFL hat demnach Auswirkungen auf beide durch ChT induzierte Effekte. Erwartungsgemäß ist der Inaktivierungsindex weniger empfindlich gegenüber Oxidation, jedoch nicht unempfindlich, was auf die Beteiligung weiterer Kanalbereiche hinweist. Interessant ist die unter Kontrollbedingungen verglichen mit rNav1.8_IFM beeinträchtigte Inaktivierung bei rNav1.8_IFL. Hierbei kann es sich jedoch um eine durch die geringe Größe des vorliegenden Datensatzes verursachte Beobachtung handeln: man beobachtet bei rNav1.8 starke Unterschiede in der Vollständigkeit der Inaktivierung in Abhängigkeit vom Alter und der Passage der Zellen. Der Inaktivierungsindex bei über einen größeren Zeitraum gemessenen Zellen beträgt bei rNav1.8_IFM 0.689 ± 0.142 ($n = 34$).

3.3.3 Einfluss von ChT auf Nav1.4/Nav1.8 Chimären

In Abb. 3-31A sind Stromantworten aller Chimären vor und 450 s nach Beginn der Exposition von 10 μ M Chloramin-T gezeigt. Die zugehörigen Verläufe von maximalem Einwärtsstrom und Inaktivierungsindex sind als Mittelwerte mit SEM für 4-6 Zellen darunter abgebildet (Abb. 3-31B). Zunächst fällt auf, dass eine gravierende Reduktion der Stromamplitude nur bei zwei Chimären auftritt: 8844 und 8444. Der relative Reststrom nach 200 s beträgt $34.8 \pm 7.5\%$ bei 8844 ($n = 4$) und $42.1 \pm 6.7\%$ bei 8444 ($n = 5$) und ist damit sogar noch geringer als bei rNav1.8. Eine leichte Reduktion des Spitzenstromes von ca. 10% findet sich bei 4488 und 4484 (Abb. 3-31C). Hingegen steigt die Stromamplitude bei 4844 und 4448 sofort mit Beginn des einsetzenden Inaktivierungsverlustes an. Basierend auf den Ergebnissen aus 3.2 ist dies bei 4844 zu erwarten. Bei dieser Chimäre steigt die Stromamplitude auch kontinuierlich mit Zunahme des Inaktivierungsverlustes an, während die Stromzunahme bei 4448 nur zu Beginn der Applikation erfolgte und dann nach ca. 200 s in Sättigung geht.

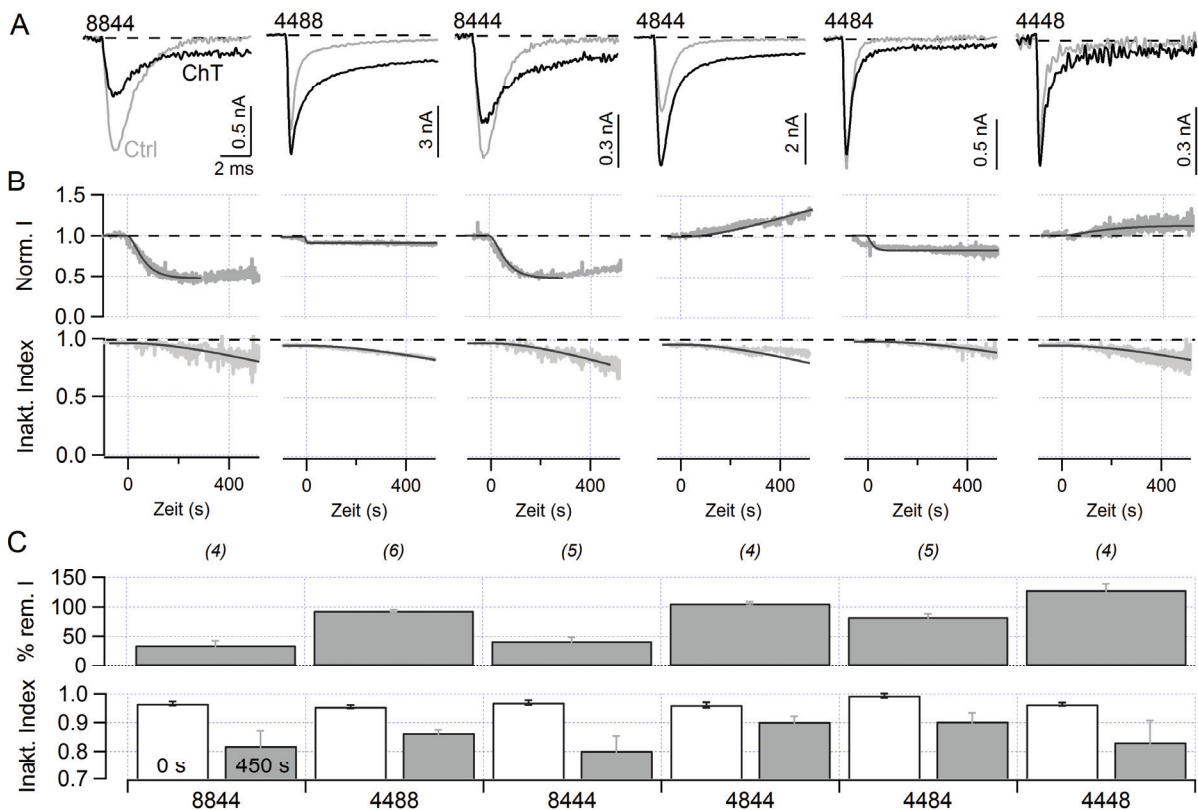


Abb. 3-31 **A** Stromantworten auf Depolarisationen auf 0 mV vor (grau) und nach 450 s Applikation von 10 μ M ChT (schwarz) für die Nav1.4/Nav1.8 Chimären. **B** Verlauf des normalisierten Einwärtsstromes (oben) und des Inaktivierungsindex bei Applikation von 10 μ M ChT (Beginn bei $t = 0$). Gezeigt sind die Verläufe gemittelt für 4-6 Zellen mit SEM mit Anpassungen nach Gl. (8). **C** Gemittelter Block des Einwärtsstromes nach 450 s (oben) und Inaktivierungsindex vor und nach 450 s Applikation von 10 μ M ChT (unten).

Zudem zeigen alle Chimären eine deutliche Verringerung des Inaktivierungsindex. Zum Vergleich sind in Abb. 3-31C der Inaktivierungsindex vor Beginn der Applikation und nach 450 s unter 10 μ M ChT aufgetragen, alle Zahlenwerte finden sich in Tabelle 7 im Anhang. Aufgrund der unter Kontrollbedingungen verschiedenen Inaktivierungsindices werden zum Vergleich der Sensitivität wieder auf den Index vor Applikation normierte Indices ($I_{dx_{norm}} = I_{dx_{0s}}/I_{dx_{450s}}$) genutzt. Die Chimären weisen geringe Unterschiede in der Sensitivität auf, etwa reagieren 8444 (0.826 ± 0.260) und 8844 (0.848 ± 0.295) am stärksten, 4844 (0.939 ± 0.253) und 4484 (0.911 ± 0.308) am schwächsten. Jedoch liegen die mittleren normierten Indices aller Chimären innerhalb der Fehlergrenzen von rNav1.8 ($0.832 - 0.916$).

3.3.4 Spannungsabhängigkeit des ChT Effektes

Beide durch die Applikation von Chloramin-T bei Nav1.8 induzierte Effekte, die anfängliche Reduktion des Spitzenstromes und der Verlust der schnellen Inaktivierung, wurden bei verschiedenen Membran-Depolarisationen analysiert. In Abb. 3-32A sind die Stromantworten einer mit rNav1.8_IFM transfizierten Neuro-2A Zelle auf Depolarisation auf -20 mV, -10 mV, 0 mV und 10 mV vor und während der Applikation von 10 μ M ChT gezeigt.

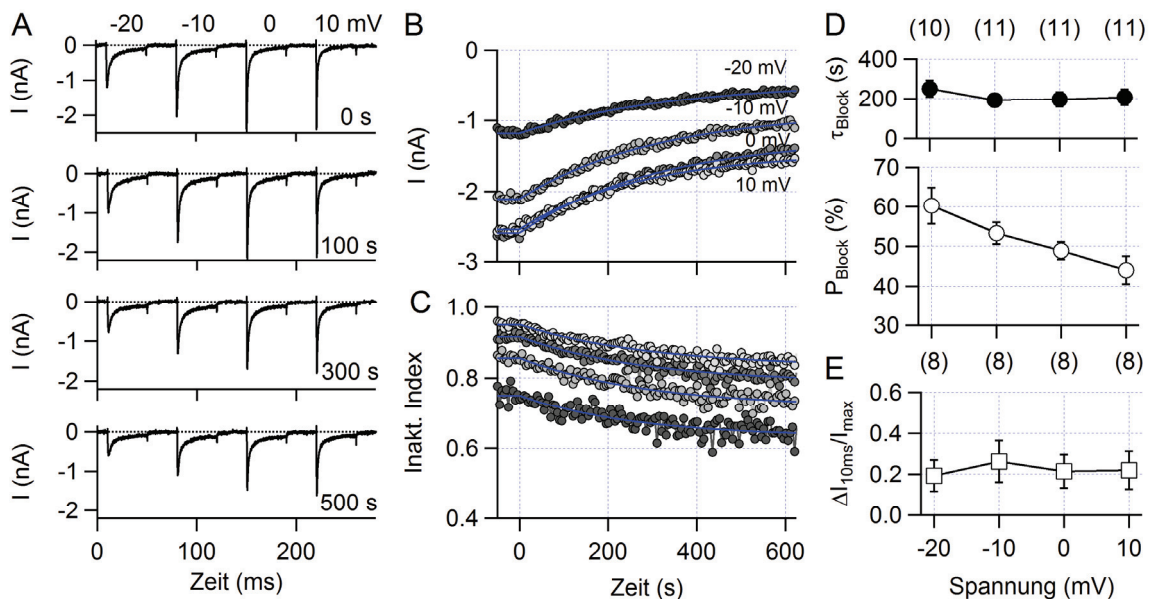


Abb. 3-32 Spannungsabhängigkeit der ChT induzierten Reduktion des Spitzenstromes. **A** Stromantworten von rNav1.8_IFM vor Beginn der Applikation von 10 μ M ChT (0 s) und nach 100 s, 300 s und 500 s Applikationsdauer. **B** Änderung des Spitzenstromes und **C** Änderung des 10 ms-Inaktivierungsindex bei den angegebenen Spannungen. Beginn der Applikation bei $t = 0$ s. Blaue Linien sind Anpassungen nach Gl. (8) mit $n = 1$. **D** Zeitkonstanten für Erreichen des ChT induzierten Blockes (τ_{Block}) und relative Reduktion des Spitzenstromes (P_{Block}). **E** Absoluter Inaktivierungsverlust.

Die Verläufe der Spitzenströme (Abb. 3-32B) und des 10 ms – Inaktivierungsindex (Abb. 3-32C) können mit Gleichung (5, 6) angepasst werden. Es zeigt sich, dass die Zeitkonstante τ_{Block} bei allen Spannungen mit etwa 200 s gleich ist ($n = 10 - 11$, Abb. 3-32D). Hingegen ist der Anteil

des geblockten Stromes bei Depolarisation auf -20 mV mit $67.7 \pm 4.6\%$ ($n = 10$) am größten und wird mit steigender Depolarisations-Stärke geringer. Bei -10 mV werden $53.3 \pm 2.8\%$ ($n = 11$) geblockt, bei 0 mV $48.9 \pm 2.2\%$ ($n = 11$) und bei 10 mV $44.0 \pm 3.5\%$ ($n = 11$) (Abb. 3-32D).

Zusammenfassend ist es nicht möglich, die starke Empfindlichkeit der Inaktivierung von rNav1.8 gegenüber ChT einer einzelnen Domäne zuzuordnen. Vielmehr ist jede Domäne für sich ausreichend, um die Empfindlichkeit von Nav1.4 zu erhöhen. Hingegen scheint der ChT induzierte Block mit Domäne-1 von Nav1.8 assoziiert zu sein und eine Spannungsabhängigkeit aufzuweisen. Interessanterweise findet man den Block in 8844 sogar noch leicht verstärkt vor, obwohl die Domäne-2 für sich zu einem sofortigen starken Anstieg des Spitzenstromes bei geringem Inaktivierungsverlust führt.

3.4 Spleißvarianten von hSCN10A

3.4.1 Identifikation und Quantifizierung

mRNA aus humanen DRG-Neuronen (Bereitstellung durch Prof. Dr. Mawrin, Institut für Neuro-pathologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) wurde isoliert, die gewonnene cDNA auf Spleißvarianten von SCN10A untersucht und die Häufigkeit der Ereignisse mittels Kapillarelektrophorese von fluoreszenzmarkierten RT-PCR Produkten bestimmt (AG Dr. Matthias Platzer, FLI Jena).

Abb. 3-33A zeigt die Struktur eines spannungsgesteuerten Natriumkanals mit Markierung der hypothetischen Lage der Exon-Übergänge bei Nav1.8. Folgende Spleißvarianten wurden für hSCN10A gefunden. Zum einen kann Überspringen (*skipping*) von Exon 11 – einem 98 Aminosäuren langen Abschnitt in der intrazellulären Verbindung von Domäne-1 und 2 – auftreten (Abb. 3-33A, B). Es existieren somit die Varianten hNav1.8-e11 und hNav1.8+e11. Der Anteil von hNav1.8-e11 in adulten humanen DRG-Neuronen betrug 5% in Proben dreier Individuen. Dieses Spleißereignis wurde jedoch weder in Gewebe der Ratte noch der Maus gefunden und ist demnach nicht konserviert zwischen Mensch und Nagern.

Des Weiteren liegt an der Grenze von Intron 16 und Exon 17 ein sogenannter NAGNAG-Tandem-Spleiß-Akzeptor vor. So ist die Bildung einer Kanalvariante, die im intrazellulären Verbindungsstück zwischen Domäne-2 und Domäne-3 des Kanalproteins um einen Glutamin-Rest (Q1030) verkürzt ist (Nav1.8-Q und Nav1.8+Q) möglich (Abb. 3-33A, C, D). Nav1.8-Q findet sich in DRG-Neuronen des Menschen mit einer Häufigkeit von $14.1 \pm 0.1\%$, bei der Ratte mit $11.2 \pm 0.2\%$ und bei der Maus sogar mit $64.3 \pm 0.3\%$ (Schirmeyer *et al.*, 2010).

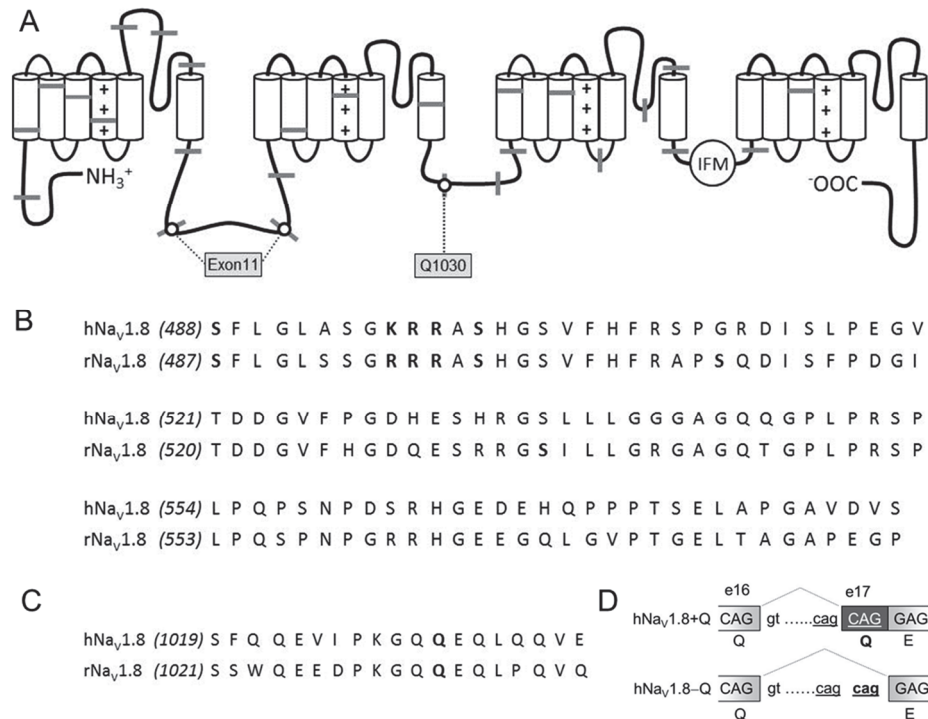


Abb. 3-33 A Topologisches Modell von hNav_v1.8 mit Kennzeichnung der Exon-Übergänge (graue Balken). hNav_v1.8 besitzt 27 Exons, deren Längen zwischen 54 bp (Exon 23) und 1217 bp (Exon 27) liegen (NM_006514.2). Markierung von Exon 11 und Q1030 an der Grenze von Exon 16 und Exon 17. **B** Aminosäuresequenzen von Exon 11 aus Nav_v1.8 des Menschen im Vergleich mit Nav_v1.8 aus *Rattus norvegicus*. Hervorgehoben sind potentiell durch PKA phosphorylierte Serin-Reste und ein hypothetisches ER Retentions-Signal. **C** Aminosäuresequenzen im Bereich des Exon 16 - Exon 17 Überganges von hNav_v1.8 und rNav_v1.8. Q1030 ist hervorgehoben. **D** Schematische Darstellung des Spleißens am NAGNAG Tandem-Spleiß-Akzeptor.

3.4.2 Elektrophysiologische Beschreibung

3.4.2.1 hNav_v1.8-Q

Beide durch Spleißen am NAGNAG-Tandemakzeptor gebildete Varianten (hNav_v1.8-Q, hNav_v1.8+Q) bilden funktionelle Kanäle nach heterologer Expression in Neuro-2A-Zellen, wobei kein Unterschied in den erreichten Stromdichten erkennbar ist. Nav_v1.8-Q zeigt bei 0 mV im Mittel 74.7 ± 14.3 pA/pF und Nav_v1.8+Q 68.9 ± 14.1 pA/pF (je $n = 15$). Abb. 3-34A zeigt Stromantworten beider Kanäle. Auch alle, die Schalteigenschaften der Kanäle beschreibenden, Parameter unterscheiden sich nicht. Die Strom-Spannungs-Kennlinien sind in Abb. 3-36B gezeigt. V_m beträgt bei Nav_v1.8-Q -10.3 ± 2.1 mV und bei Nav_v1.8+Q -12.9 ± 2.1 mV, k_m ist 20.0 ± 0.7 mV bei Nav_v1.8-Q und 20.7 ± 1.1 mV bei Nav_v1.8+Q (jeweils $n = 15$). Die Gleichgewichtsaktivierung (Abb. 3-34C) liefert folgende Werte: V_h ist -80.4 ± 2.7 mV für Nav_v1.8-Q und -79.6 ± 1.6 mV für Nav_v1.8+Q; k_h beträgt 8.5 ± 0.4 mV bzw. 7.5 ± 0.4 mV (jeweils $n = 15$). Auch die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung jeweils bestimmt bei Haltepotentialen von -90 mV und -120 mV erfolgt bei beiden Kanälen gleich schnell mit Zeitkonstanten von $\tau_{rec}(-90)$ 21.2 ± 5.0 ms für Nav_v1.8-Q

und 18.6 ± 1.7 ms für $\text{Nav}1.8+\text{Q}$ und $\tau_{\text{rec}}(-120)$ 14.3 ± 3.2 ms $\text{Nav}1.8-\text{Q}$ und 10.8 ± 0.2 ms $\text{Nav}1.8+\text{Q}$ (Schirmeyer *et al.*, 2010).

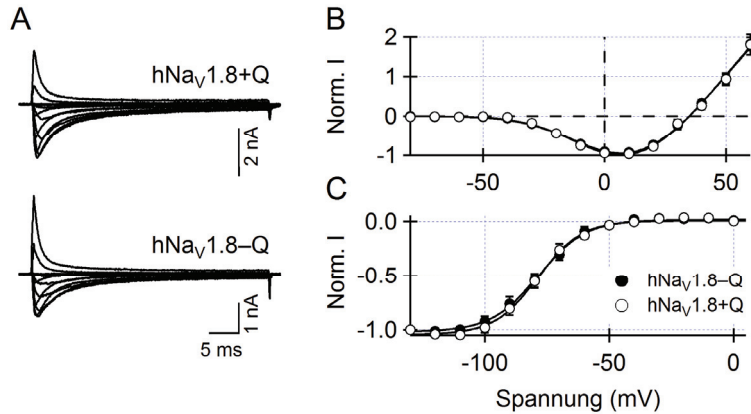


Abb. 3-34 **A** Stromantworten von $\text{hNav}1.8+\text{Q}$ und $\text{hNav}1.8-\text{Q}$ auf Depolarisation von -100 bis 60 mV. **B** Strom-Spannungs-Charakteristiken für beide Spleiß-Varianten mit Anpassungen nach Gleichung (2). **C** Gleichgewichtsinaktivierung für beide Spleiß-Varianten mit Anpassungen nach Gleichung (4). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM für je $n = 15$ Zellen. Modifiziert nach Schirmeyer *et al.* (2010).

3.4.2.2 $\text{hNav}1.8-\text{e}11$

Stromspuren repräsentativer Zellen sind in Abb. 3-35 A gezeigt. Die Parameter der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung sind nicht verschieden zwischen $\text{hNav}1.8+\text{e}11$ und $\text{hNav}1.8-\text{e}11$. V_m beträgt -16.2 ± 1.4 mV bzw. -15.3 ± 1.3 mV und k_m ist 18.4 ± 0.5 mV bzw. 19.0 ± 0.3 mV bei $\text{hNav}1.8+\text{e}11$ ($n = 30$) und $\text{hNav}1.8-\text{e}11$ ($n = 23$) (Abb. 3-35).

Die Parameter zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung bestimmt durch Anpassen mit einer Boltzmann-Funktion (Abb. 3-35) sind ebenfalls nicht verschieden bei diesen beiden Kanälen. V_h ist -76.1 ± 1.3 mV bzw. -77.0 ± 1.8 mV für $\text{hNav}1.8+\text{e}11$ ($n = 27$) und $\text{hNav}1.8-\text{e}11$ ($n = 16$), k_h ist 8.0 ± 0.3 mV bzw. 7.7 ± 0.3 mV.

Die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung wurde bei einem Haltepotential -120 mV bestimmt. Anpassen der Fraktion verfügbarer Kanäle mit einer doppelt-exponentiellen Funktion lieferte folgende Zeitkonstanten. $\tau_{\text{rec}1}$ betrug 3.5 ± 0.5 ms und 4.2 ± 0.5 ms, $\tau_{\text{rec}2}$ betrug 23.8 ± 3.0 ms und 25.9 ± 3.6 ms für $\text{hNav}1.8+\text{e}11$ ($n = 15$) und $\text{hNav}1.8-\text{e}11$ ($n = 15$). Der Anteil der schnellen Komponente an der Gesamtamplitude war bei beiden Kanälen gleich (0.52 ± 0.04 $\text{hNav}1.8+\text{e}11$ bzw. 0.46 ± 0.05 $\text{hNav}1.8-\text{e}11$) (Abb. 3-35).

Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der schnellen Inaktivierung unterscheiden sich somit nicht zwischen $\text{hNav}1.8+\text{e}11$ und $\text{hNav}1.8-\text{e}11$, ebenso wie die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung. Die Zeitkonstanten der Aktivierung und Inaktivierung wurden bestimmt, wobei auch hier keine Unterschiede zwischen $\text{hNav}1.8+\text{e}11$ und $\text{hNav}1.8-\text{e}11$ beobachtet wurden (Abb. 3-35F).

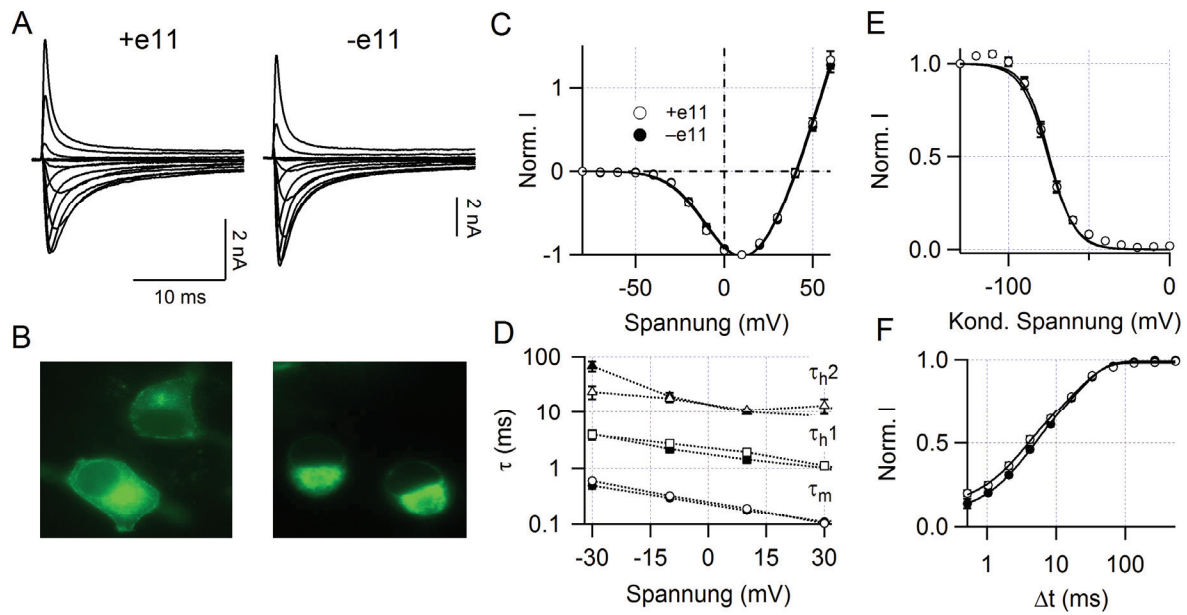


Abb. 3-35 **A** Stromspuren von hNav_{1.8}+e11 und hNav_{1.8}-e11 Kanälen exprimiert in Neuro-2A-Zellen. **B** Mikroskopie hNav_{1.8}+e11-EGFP und hNav_{1.8}-e11-EGFP in Neuro-2A. **C** Strom-Spannungs-Charakteristiken für n = 30 (hNav_{1.8}+e11) bzw. n = 23 (hNav_{1.8}-e11) Zellen mit Anpassungen nach Gl. (2). **D** Kinetik der Aktivierung (τ_m , Kreise) und Inaktivierung (τ_{h1} , Quadrate und τ_{h2} , Dreiecke). Die Marker sind durch Linien verbunden. **E** Gleichgewichts-inaktivierung gemittelt für n = 27 (+e11) und n = 16 (-e11) Zellen mit SEM mit Anpassungen nach Gl. (4). **F** Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung bei einem Haltepotential von -120 mV mit doppelt-exponentiellen Anpassungen nach Gl. (5) für je n = 15 Zellen.

Die Koexpression von β_3 Untereinheiten kann die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bei Nav_{1.8} beeinflussen (Vijayaragavan *et al.*, 2004b; Wilson *et al.*, 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind jedoch stark verschieden: Vijayaragavan *et al.* (2004b) beschreiben eine Verschiebung von V_h um 5 mV, während Wilson *et al.* (2011) eine Verschiebung um -18 mV beschreiben. Da man eine Interaktion von β_3 mit einer Region innerhalb Exon 11 annimmt (Zhang *et al.*, 2008), wurde die cRNA von hNav_{1.8}+e11 und hNav_{1.8}-e11 in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. V_h und k_h von hNav_{1.8}+e11 und hNav_{1.8}-e11 unterschieden sich nicht in Gegenwart von β_3 (n = 12-16, alle P > 0.06). Als Kontrolle wurde hNav_{1.8}+e11 mit und ohne β_3 verglichen, wobei keine Änderung der V_h und k_h Werte festgestellt wurde (n = 12-19, alle P > 0.1).

Die Stromantworten der langen und der kurzen hNav_{1.8} Variante auf langsame Spannungsrampen sind in Abb. 3-36 gezeigt. Die gemessenen Rampenströme wurden auf die in der zuvor aufgenommenen Strom-Spannungs-Beziehung ermittelten, maximalen transienten Einwärtsströme normiert und über der Rampen-Spannung aufgetragen (Abb. 3-36B). Die maximalen in der Rampe erreichten Einwärtsströme unterscheiden sich nicht signifikant zwischen hNav_{1.8}+e11 und hNav_{1.8}-e11 (alle P > 0.05) (Abb. 3-36C).

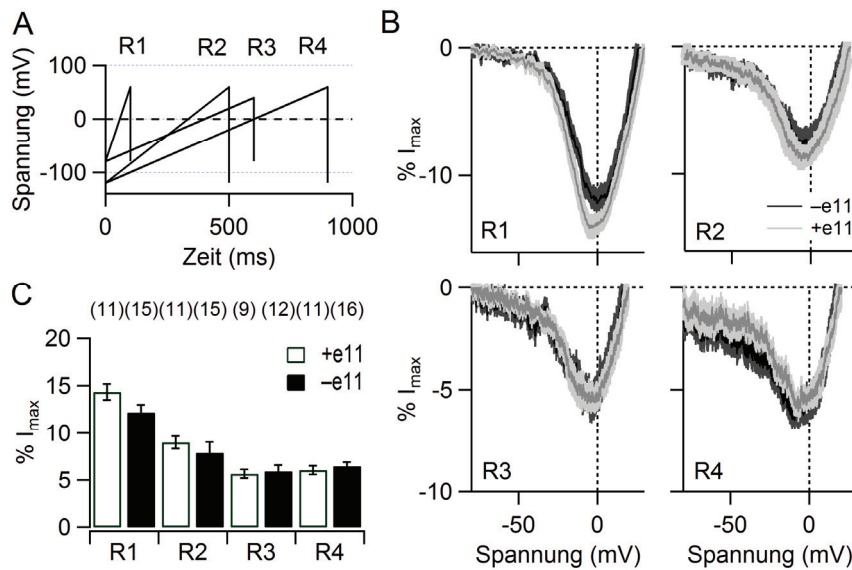


Abb. 3-36 Spannungsrampen **A** Skizze der Pulsprotokolle. **B** Gemittelte normierte Stromantworten auf die Rampen-Stimuli für hNav_{1.8}+e11 (hell) und hNav_{1.8}-e11 (dunkel). **C** Mittlere maximale Rampen-Einwärtsstromdichten für hNav_{1.8}+e11 (weiß) und hNav_{1.8}-e11 (schwarz).

3.4.3 Einfluss alternativen Spleißens auf die Expressionsstärke

Beide hNav_{1.8} Isoformen produzierten exprimiert in Neuro-2A-Zellen stabile Natriumströme mit gleichen mittleren maximalen Einwärtsstromdichten bei Depolarisation auf 0 mV (98.9 ± 17.4 pA/pF, $n = 36$ hNav_{1.8}+e11 und 91.9 ± 14.0 pA/pF, $n = 25$ hNav_{1.8}-e11, $P > 0.7$) (Abb. 3-37A). Somit hat das Auslassen der Exon-11 Sequenz keinen Einfluss auf die Bildung und die Membranintegration funktionaler Nav_{1.8}-Kanäle in diesem Expressionssystem.

Um sicher zu stellen, dass nur Zellen, die auch das Nav_{1.8} kodierende Plasmid enthalten, in die Statistik einfließen, wurden Fusionsproteine von hNav_{1.8} mit einem C-terminal gekoppelten EGFP in ND7/23-Zellen exprimiert. Die gemittelten maximalen Einwärtsstromdichten von Zellen mit intensiver grüner Fluoreszenz unterschieden sich nicht zwischen hNav_{1.8}+e11 und hNav_{1.8}-e11 (Abb. 3-37A).

Zhang *et al.* (2008) zeigten, dass die heterologe Expression von Nav_{1.8} der Ratte in nicht-neuronalen Zellen aufgrund eines ER-Retentionssignales (RRR) im Bereich der die Domänen-1 und 2 verbindenden Sequenz eingeschränkt ist. Dieses Motiv liegt im Bereich von Exon 11 und ist nicht streng konserviert zwischen Nav_{1.8} von Ratte und Maus (RRR) und Nav_{1.8} des Menschen (KRR). HEK293-Zellen wurden mit hNav_{1.8}+e11 und hNav_{1.8}-e11 transfiziert, um einen Einfluss des Exon-11 *Skipping* auf die Expression des Kanals in nicht-neuronalen Zellen zu untersuchen. Stromdichten bei Depolarisationen, die zu maximalen Einwärtsstromdichten führen (0 mV), wurden verglichen (Abb. 3-37). Bei beiden Spleißvarianten wurden nur sehr geringe Stromdichten, im Bereich der in nicht transfizierten HEK293-Zellen auftretenden, gefunden (2.8 ± 2.3 pA/pF, $n = 31$ bei hNav_{1.8}+e11 und 4.2 ± 2.0 pA/pF, $n = 37$ bei hNav_{1.8}-e11, $P > 0.6$).

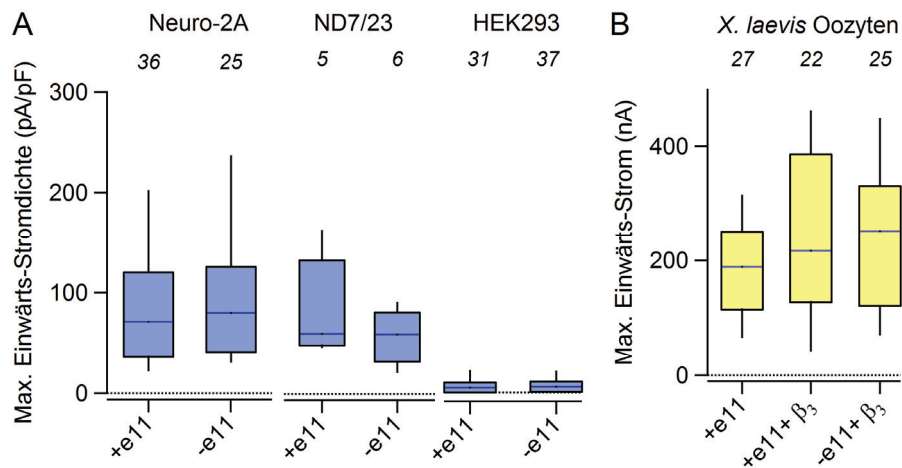


Abb. 3-37 Einfluss des Exon-11 *Skipping* auf die Expressionsstärke von hNav1.8 in heterologen Systemen. **A** Maximale Einwärtsstromdichten bei 0 mV von hNav1.8+e11 (+e11) und hNav1.8-e11 (-e11) Kanälen exprimiert in Neuro-2A, ND7/23 bzw. HEK293 Zellen. Die Mediane liegen (in Reihenfolge der Darstellung) bei 71.5 pA/pF, 80.0 pA/pF, 59.5 pA/pF, 58.8 pA/pF, 4.5 pA/pF und 5.9 pA/pF. **B** Maximale Einwärtsstrom-Amplituden bei 10 mV von *X. laevis* Oozyten injiziert mit cRNA von hNav1.8+e11 + H₂O (Median bei 188.7 nA) bzw. hNav1.8+e11 + h β_3 (216.5 nA) sowie hNav1.8-e11 + h β_3 (253.4 nA).

Zhang *et al.* (2008) beschrieben außerdem, dass die Nav- β_3 Untereinheit über Interaktion mit dem ER-Retentionssignal die Expression des Kanals Nav1.8 positiv beeinflussen kann. Daher wurden des Weiteren HEK293-Zellen mit humaner β_3 -Untereinheit allein oder mit humaner β_3 -Untereinheit und hNav1.8+e11 transfiziert. In beiden Fällen unterschieden sich die gemessenen Einwärtsstromdichten nicht (9.7 ± 4.3 pA/pF, $n = 4$ bzw. 9.8 ± 1.7 pA/pF, $n = 13$). Ebenso waren die maximalen Einwärtsströme in injizierten *Xenopus laevis* Oozyten in Gegenwart von humaner β_3 nicht verschieden zwischen den Spleißvarianten (248.4 ± 32.3 nA bei hNav1.8+e11 bzw. 242.1 ± 27.1 nA bei hNav1.8-e11, $n = 22-24$, $P > 0.8$) (Abb. 3-39B). β_3 beeinflusste auch nicht die Expression der langen Spleißvariante (195.0 ± 19.4 nA, $n = 27$ Koinjektion von H₂O statt β_3 , $P > 0.1$) (Abb. 3-37B).

Die von Exon 11 kodierte Protein-Sequenz beinhaltet mögliche Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase A (Abb. 3-38B). Für rNav1.8 ist eine Regulation durch PKA-Phosphorylierungen beschrieben wurden. Experimentell wird dazu ein Aktivator der Adenylatcyclase, Forskolin (FSK), zur Stimulation der PKA eingesetzt. Die Applikation von FSK auf Nav1.8 der Ratte exprimierende Zellen soll sowohl akut (Fitzgerald *et al.*, 1999), als auch langfristig (Liu *et al.*, 2010) die Stromamplitude von Nav1.8 erhöhen. Daher wurden in einem weiteren Experiment die mit hNav1.8+e11 oder hNav1.8-e11 transfizierten Neuro-2A-Zellen mit 10 μ M FSK für 1 h bei 37 °C und 10% CO₂ inkubiert. Für die Messungen wurde die FSK-Lösung gegen normale Badlösung ausgetauscht. In Abb. 3-38A sind Stromantworten von derart vorbehandelten Zellen und nicht behandelten Zellen gezeigt.

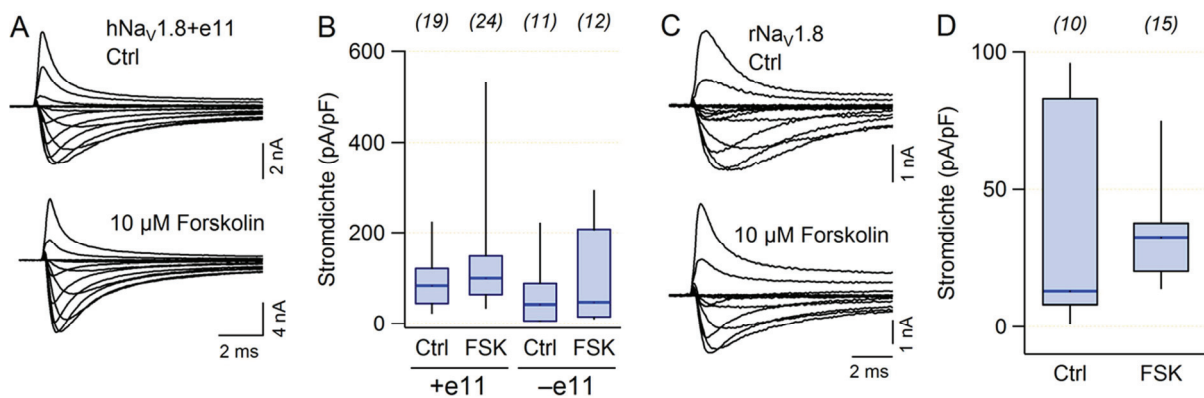


Abb. 3-38 Inkubation der transfizierten Zellen mit 10 μ M FSK für 1 h vor Beginn der Messung. **A** Stromantworten von hNav_{1.8}+e11 (Neuro-2A) ohne bzw. mit FSK. **B** Stromdichten bei 0 mV für hNav_{1.8}+e11 und hNav_{1.8}-e11 ohne bzw. mit FSK. **C** Stromantworten von rNav_{1.8} (ND7/23) und **D** Stromdichte bei 0 mV von nicht-inkubierten (Ctrl) und vorinkubierten Zellen.

Die bei Depolarisation auf 0 mV ermittelten Stromdichten sind für beide Kanäle mit und ohne FSK-Inkubation in Abb. 3-38B dargestellt. Die Stromdichten sind sowohl bei hNav_{1.8}+e11 als auch bei hNav_{1.8}-e11 bei vorinkubierten Zellen nicht signifikant erhöht (*Student's t-Test*, *Mann-Whitney U Test*) gegenüber den nicht vorbehandelten Zellen (Abb. 3-38). Da die PKA Konsensus-Sequenzen bei rNav_{1.8} nicht alle bei hNav_{1.8} konserviert sind, wurde das Experiment mit rNav_{1.8} wie in Liu *et al.* (2010) beschrieben, wiederholt (Abb. 3-38C). Hier konnte tendenziell eine Erhöhung der Stromdichten durch FSK festgestellt werden: Der Median beträgt 12.8 pA/pF in der Kontrolle bzw. 32.4 pA/pF bei mit FSK inkubierten Zellen, jedoch liegt auch hier nach *Student's t-Test* und *Mann-Whitney U Test* keine Signifikanz vor (Abb. 3-38D).

Es wird hier gezeigt, dass hNav_{1.8}-e11 in allen untersuchten Schaltparametern und der Expression der langen Isoform hNav_{1.8}+e11 entspricht. Es ist denkbar, dass ein Einfluss des Spleißereignisses auf die Eigenschaften des Kanals in rekombinanten Expressionssystemen nicht-humanen Ursprungs nicht sichtbar ist. Interessanterweise findet man diese Spleißvariante nur beim Menschen, nicht jedoch bei Ratte und Maus.

3.5 Expressionsregulation bei Nav1.8

Mit Nav_{1.8} cDNA transfizierte Zellen exprimieren den Kanal in sehr unterschiedlichem Ausmaß abhängig davon, ob es sich um eine Zelllinie neuronalen oder nicht-neuronalen Ursprungs handelt. Abb. 3-39 zeigt Stromspuren aufgenommen an neuronalen (Neuro-2A, ND7/23) und nicht-neuronalen (HEK293, tsA201), mit rNav_{1.4} bzw. rNav_{1.8} und hNav_{1.8}, transfizierten Zellen. Als Maß für die Expressionsstärke wird der auf die Gesamtkapazität der Zelle normalisierte Strom, die Stromdichte in pA/pF, angegeben. Dies erfolgt bei einer Depolarisationsspannung von 0 mV, da dort bei Nav_{1.8} der maximale Einwärtsstrom gemessen werden kann.

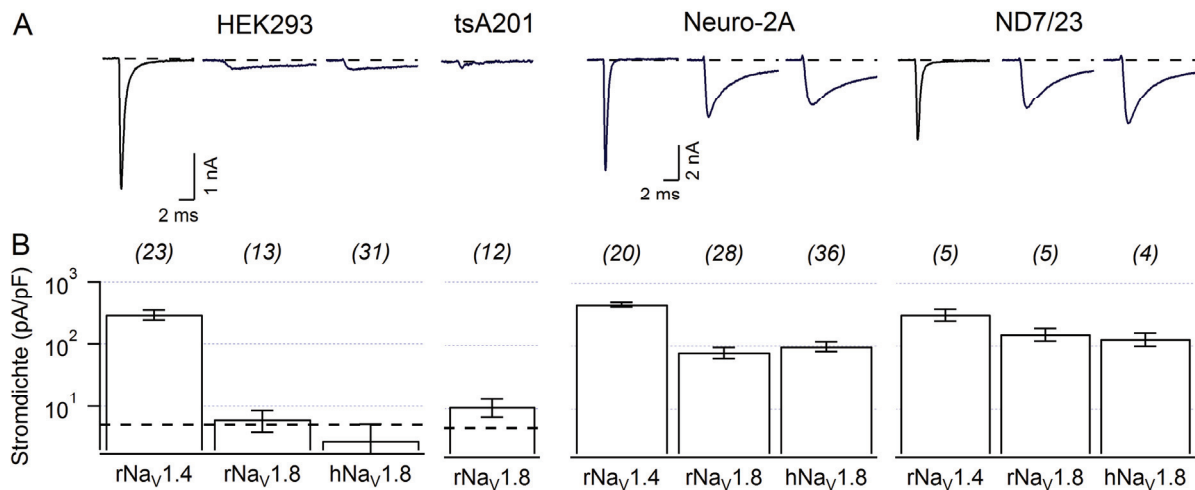
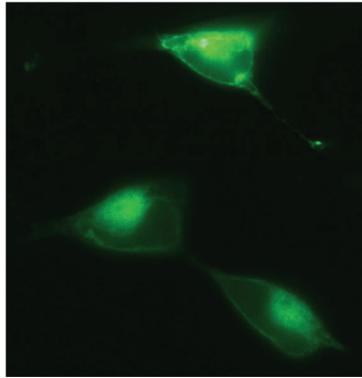


Abb. 3-39 Vergleich der Expressionsstärke von Na_v1.4 und Na_v1.8. **A** Stromantworten bei 0 mV. Es wurden für die Abbildung HEK293 Zellen ausgewählt welche aufgrund der langsamen Inaktivierungskinetik der Ströme auf eine Expression von Na_v1.8 schließen lassen. **B** Stromdichten bei 0 mV für die angegebenen Kanäle. Die gestrichelte Linie markiert die in nicht transfizierten HEK293-Zellen im Mittel gemessene Einwärtsstromdichte bei 0 mV.

In HEK293 und tsA201 Zellen wurden Einwärtsstromdichten von 6.2 ± 2.2 pA/pF ($n = 13$) bzw. 10.7 ± 3.3 pA/pF ($n = 12$) für rNa_v1.8 gemessen. hNa_v1.8 exprimiert in HEK293 Zellen lieferte Stromdichten von 2.8 ± 2.3 pA/pF ($n = 31$). Hingegen misst man nach Transfektion von rNa_v1.4 in HEK293 Zellen um zwei Größenordnungen höhere Stromdichten von 294.3 ± 53.3 pA/pF ($n = 23$). Die nach Transfektion von Na_v1.8 gemessenen Ströme liegen somit im Bereich der in nicht transfizierten HEK293-Zellen messbaren Ströme von 5.1 ± 0.7 pA/pF ($n = 5$) (Abb. 3-39). In neuronalen Zellen hingegen kann sowohl humaner Na_v1.8 als auch Na_v1.8 der Ratte sehr gut exprimiert werden. Die gemessenen Stromdichten sind in Neuro-2A (rNa_v1.8: 80.0 ± 15.9 pA/pF ($n = 28$); hNa_v1.8: 98.9 ± 17.4 pA/pF ($n = 36$)) und in ND7/23 (rNa_v1.8: 144.9 ± 34.8 pA/pF ($n = 5$); hNa_v1.8: 129.6 ± 30.2 pA/pF ($n = 4$)) Zellen ähnlich (immer in Gegenwart von 300 nM TTX), und liegen damit in der gleichen Größenordnung wie Na_v1.4 (452.9 ± 38.2 pA/pF ($n = 20$) in Neuro-2A und 312.6 ± 67.3 pA/pF ($n = 5$) in ND7/23) (Abb. 3-39).

Dass es sich bei den geringen in HEK293-Zellen gefundenen Strömen tatsächlich nicht ausschließlich um endogenen Strom sondern auch um transfizierten Na_v1.8 handelt, lässt sich durch Einsatz von EGFP-Fusionskonstrukten oder von Na_v1.8-IFC nachweisen. Einen optischen Nachweis der Bildung des Proteins liefern die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von hNa_v1.8-EGFP in Neuro-2A und HEK293-Zellen (Abb. 3-40).

A HEK293



B Neuro-2A

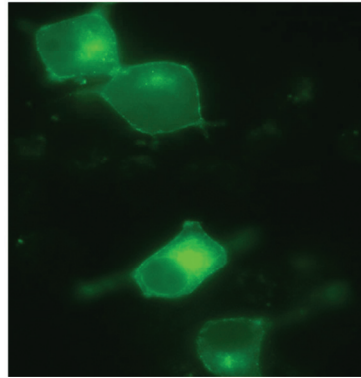


Abb. 3-40 Fluoreszenz-Aufnahmen von hNav1.8-EGFP exprimiert in nicht-neuronalen (HEK293) und neuronalen Zellen (Neuro-2A) (63er Ölimmersions-Objektiv).

Transfiziert man HEK293 Zellen mit hNav1.8-IFC, sind unter Kontrollbedingungen kaum langsam inaktivierende (d.h. nach 10 ms Pulsdauer nicht vollständig inaktivierte) Ströme, wie sie für Nav1.8 charakteristisch sind, messbar. Nach Applikation von DTNP und Entfernung der schnellen Inaktivierung, verbunden mit dem bereits beschriebenen dadurch bedingten Stromzuwachs (hier um den Faktor 14.0 ± 3.7 , $n = 4$), ist Nav1.8 in HEK293-Zellen messbar (Abb. 3-41A). Von neun getesteten transfizierten HEK293-Zellen wurde nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DTNP bei vier Zellen hNav1.8_IFC-Strom sichtbar (Abb. 3-41B).

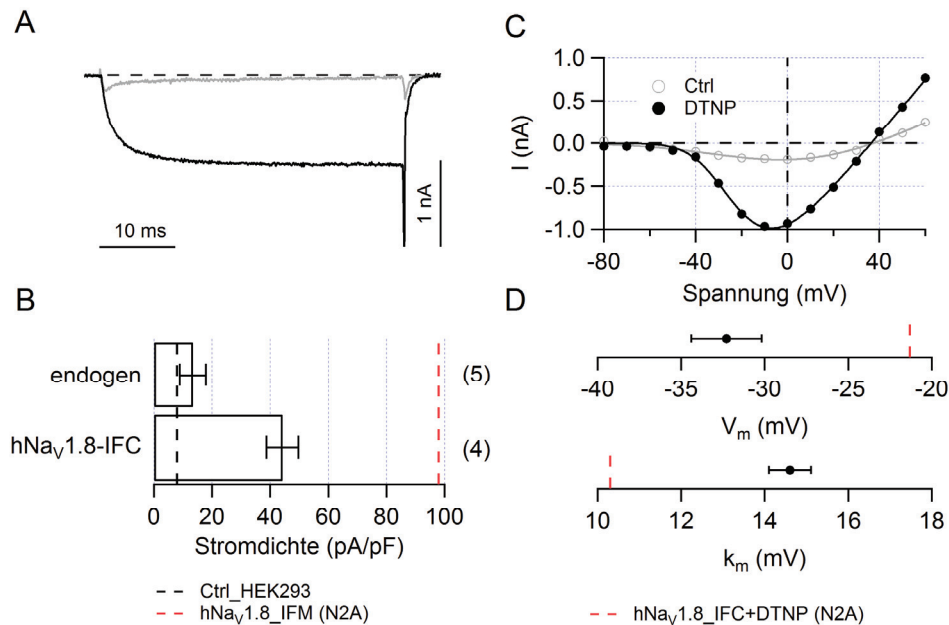


Abb. 3-41 hNav1.8_IFC in HEK293-Zellen. **A** Stromantworten bei 0 mV vor (grau) und nach Applikation von $100 \mu\text{M}$ DTNP (schwarz). **B** Stromdichte bei 0 mV. Die gestrichelte schwarze Linie markiert den endogenen HEK293-Natriumstrom vor Applikation von DTNP. Die gestrichelte rote Linie markiert die mit hNav1.8_IFC unter Kontrollbedingungen in Neuro-2A-Zellen gemessenen Stromdichten. **C** Strom-Spannungs-Kennlinie für die in A gezeigte Zelle vor (Ctrl) und nach Applikation von DTNP mit Anpassungen nach Gl. (2). **D** V_m und k_m für hNav1.8_IFC+DTNP in HEK293 Zellen. Die gestrichelten roten Linien markieren jeweils die mit hNav1.8_IFC+DTNP in Neuro-2A-Zellen gemessenen Werte.

Die unter DTNP erreichte Stromdichte bei 0 mV betrug $44.2 \pm 5.5 \text{ pA/pF}$, wohingegen bei den übrigen fünf Zellen die Stromdichte bei $13.1 \pm 4.5 \text{ pA/pF}$ blieb und sich damit nicht von der

unter Kontrollbedingungen gemessenen von 10.1 ± 6.0 pA/pF unterschied. Die hNav1.8 enthaltenden Zellen zeigten unter Kontrollbedingungen mit 6.8 ± 3.2 pA/pF eher niedrigere Stromdichten als die nur endogenen Natriumstrom enthaltenden Zellen. Vergleicht man das Aktivierungsschaltverhalten (Abb. 3-41C) von hNav1.8_IFC+DTNP in HEK293-Zellen mit dem in Neuro-2A-Zellen, zeigen sich Unterschiede. V_m ist mit -32.3 ± 2.1 mV ($n = 4$) deutlich negativer und k_m mit 14.6 ± 0.5 mV ($n = 4$) größer als in Neuro-2A-Zellen ($V_m = -21.3 \pm 2.4$ mV und $k_m = 10.3 \pm 0.8$ mV, $n = 13$) (Abb. 3-41D). Dabei spielt vermutlich der endogene Natriumstrom der HEK293-Zellen eine Rolle, welcher durch die immer noch verhältnismäßig geringen Stromamplituden von hNav1.8 die Ergebnisse verfälschen kann.

3.5.1 Einfluss des Kanal-C-Terminus

Austauschen des Nav1.8 C-Terminus gegen den von Nav1.4 bewirkt eine deutliche Steigerung der Expression in ND7/23 Zellen und umgekehrt (Choi *et al.*, 2004). Eine entsprechende Chimäre 8888c4 wurde für die Ratte- und die Mensch-Isoform konstruiert. Es sollte gezeigt werden, ob mit diesen Chimären eine Expression in HEK293-Zellen möglich ist. Abb. 3-42 zeigt Stromspuren für h8888c4 und r8888c4 in HEK293-Zellen. Es werden Stromdichten von 61.3 ± 10.0 pA/pF ($n = 15$) bzw. 66.2 ± 10.6 pA/pF ($n = 20$) erzielt. Man erzielt somit experimentell ausreichend große Stromamplituden, um vom Endogenstrom differenzierbare Messungen zu ermöglichen, die Stromdichten sind aber immer noch etwa um den Faktor 7 niedriger als bei rNav1.4.

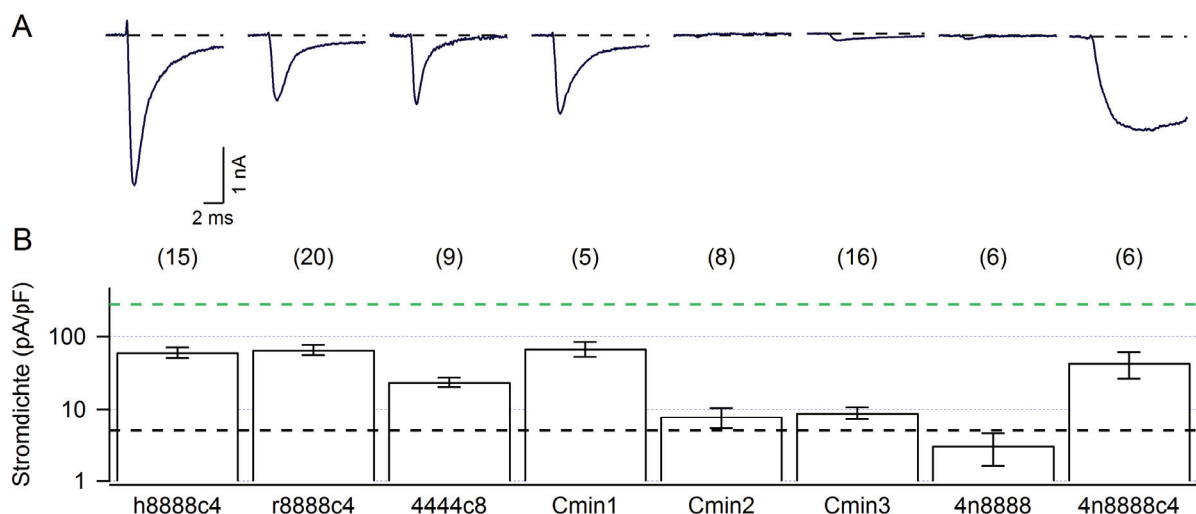


Abb. 3-42 Vergleich der Expressionsstärke von Chimären des C- und des N-Terminus aus Nav1.4 und Nav1.8 in HEK293-Zellen. **A** Stromantworten bei 0 mV. **B** Stromdichten bei 0 mV. Die schwarz gestrichelte Linie markiert den an nicht transfizierten HEK293-Zellen gemessenen Natriumstrom, die grün gestrichelte Linie markiert die Stromdichte von mit rNav1.4 transfizierten Zellen.

Um einen Vergleich dieser Chimären mit den Wildtypen zu ermöglichen, wurden beide auch in Neuro2A-Zellen untersucht. Alle Parameter der Aktivierung und Inaktivierung sind in Tabelle 8 und 9 im Anhang aufgeführt.

Die Stromdichten, die mit diesen Chimären in neuronalen Zellen erreicht werden, sind nicht höher als bei den Wildtypen (r8888c4 66.6 ± 8.1 pA/pF ($n = 8$) und h8888c4 107.5 ± 29.3 pA/pF ($n = 6$)) (Abb. 3-42, 3-43) und gleich denen in HEK293. Die Substitution des Na_v1.4-C-Terminus mit dem von rNa_v1.8, 4444c8, verschlechtert die Bildung funktionaler Kanäle in HEK293-Zellen, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei rNa_v1.8 Wildtyp beobachtet. Die Chimäre 4444c8 liefert Stromdichten von 23.9 ± 3.6 pA/pF ($n = 9$) (Abb. 3-42).

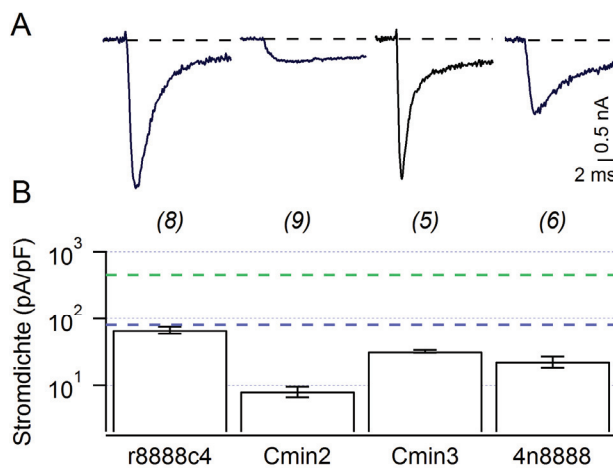


Abb. 3-43 Vergleich der Expressionsstärke von C- und N-Terminus Chimären aus Na_v1.4 und Na_v1.8 in Neuro-2A-Zellen. **A** Stromantworten bei 0 mV. **B** Stromdichten gemessen bei 0 mV. Die blau gestrichelte Linie markiert die an mit rNa_v1.8 transfizierten Zellen gemessenen Stromdichten, die grün gestrichelte Linie markiert die Stromdichte von mit rNa_v1.4 transfizierten Zellen.

Vijayaragavan *et al.* (2004a) beschreiben Chimären aus Na_v1.7 und Na_v1.8, mit denen gezeigt werden konnte, dass ein Austausch der proximalen Hälfte des Na_v1.8 C-Terminus gegen den von Na_v1.7 ausreichend ist, um die Expression in tsA201 Zellen zu steigern. Daher wurde von in dieser Arbeit eine analoge Chimäre aus rNa_v1.8 und rNa_v1.4 erzeugt, die die 130 proximalen Aminosäurereste des C-Terminus aus Na_v1.4 enthält und die im Folgenden Cmin1 (Na_v1.4-Sequenz von 1736-1865) genannt wird. Cmin1 exprimiert in HEK293 Zellen (Abb. 3-42), die erreichten Stromdichten (68.4 ± 15.9 pA/pF, $n = 5$) entsprechen denen von r8888c4. Kürzt man den Na_v1.4-Anteil nun auf die proximalen 108 Aminosäurereste weiter ein, entsteht die Chimäre Cmin2 (Sequenz + Skizze im Anhang S5). Cmin2 exprimiert in HEK293-Zellen nicht besser als rNa_v1.8 (7.9 ± 2.5 pA/pF ($n = 8$), Abb. 3-42). Die Positivkontrolle, d.h. Expression von Cmin2 in Neuro-2A-Zellen, zeigte, dass das Konstrukt funktionsfähig ist (Abb. 3-43), aber auch in diesem Expressionssystem nur sehr geringe Stromdichten von 8.0 ± 1.5 pA/pF ($n = 9$) gefunden werden. Daher wurde eine weitere Chimäre – Cmin3 (Na_v1.4-Sequenz von 1839-1865) – konstruiert, welche den Abschnitt der Na_v1.4 Sequenz enthält, die Cmin2 gegenüber Cmin1 fehlen (es handelt sich in diesem konservierten Bereich um zehn Aminosäure-Reste Sequenzunterschied). Mit Cmin3 (9.0 ± 1.7 pA/pF ($n = 16$)) konnte eine leichte Expressionssteigerung im

Vergleich zum Wildtyp erzielt werden, jedoch ist die Expression deutlich geringer als bei Cmin1 in HEK293. Abb. 3-43 zeigt Cmin3 exprimiert in Neuro-2A-Zellen, welche dort etwas geringere Stromdichten erzielt (31.8 ± 1.5 pA/pF, $n = 5$), als die Chimäre r8888c4 mit dem kompletten C-Terminus von Nav1.4.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle C-Chimären in neuronalen Zelllinien nicht zu einer Verbesserung der Expression beitragen. Betreffend HEK293-Zellen ist der Austausch des proximalen C-Terminus besonders ausschlaggebend. Ein kleiner Bereich zwischen konserviertem und wenig konserviertem Teil des C-Terminus (Cmin3) scheint zu einer geringen Verbesserung der Expression in HEK293 Zellen beizutragen.

3.5.2 Einfluss des Kanal-N-Terminus

Aufgrund der bekannten Interaktion des Nav1.8 N-Terminus mit dem Protein p11, welche für die Expression des Kanals wichtig sein kann (Okuse *et al.*, 2002), wurden die Chimären 4n8888 und 4n8888c4 konstruiert. Bei diesen beiden Chimären stammt der N-Terminus, entsprechend den jeweils ersten 127 Aminosäureresten von rNav1.4. HEK293-Zellen wurden mit 4n8888 cDNA transfiziert, es kommt jedoch nicht zur Bildung eines funktionellen Kanals (Stromdichte 3.1 ± 1.5 pA/pF, $n = 5$) (Abb. 3-42). Als Positivkontrolle zum Nachweis der Funktionsfähigkeit des Konstruktes dient die erfolgreiche Expression in der neuronalen Zelllinie Neuro-2A. Die gemessenen Stromdichten liegen bei 22.4 ± 4.4 pA/pF ($n = 6$, Abb. 3-43) und zeigen die für Nav1.8 charakteristischen Schaltparameter (Tab. 8, 9 Anhang). Die Kombination von Nav1.4 N- und C-Terminus in 4n8888c4 (43.9 ± 17.5 pA/pF, $n = 6$) führt auch in HEK293 Zellen zur Bildung eines funktionalen Kanals, bewirkt aber keine Steigerung der Expression verglichen mit r8888c4. Der Austausch des N-Terminus kann somit nicht experimentell genutzt werden, um Nav1.8 in nicht-neuronalen Zellen zu untersuchen.

4 Diskussion

Nav1.8 ist einer von neun bekannten spannungsabhängigen Natriumkanälen bei Säugern. Aufgrund seiner vorwiegenden Expression in Spinalganglien-Neuronen ist er an der Aufnahme und Weiterleitung von Schmerzreizen beteiligt (Kerr *et al.*, 2001; Foulkes *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2007). Es gibt zudem zahlreiche Evidenzen für eine Expression von Nav1.8 in intrakardialen Neuronen und eine Beteiligung an der Ausbildung kardialer Aktionspotentiale (Chambers *et al.*, 2010; Blasius *et al.*, 2011; Facer *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). Da Nav1.8 kaum in nicht-neuronalen Zelllinien heterolog exprimiert werden kann (John *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010), ist dieser Kanal vergleichsweise wenig erforscht. Es handelt sich jedoch in mehrerlei Hinsicht um einen interessanten Vertreter dieser Proteinfamilie. Nav1.8 hebt sich in seinem Schaltverhalten deutlich von anderen Nav-Kanälen ab (z. B. Elliott & Elliott, 1993; Akopian *et al.*, 1996) und auch in der Empfindlichkeit gegenüber bekannten Neurotoxinen nimmt Nav1.8 eine Sonderstellung ein (Sivilotti *et al.*, 1997; Saab *et al.*, 2002; Markgraf *et al.*, 2012). Beispielsweise zeichnet sich der im Skelettmuskel exprimierte Kanal Nav1.4 durch schnell aktivierende und schnell inaktivierende Ströme aus und gehört zu den TTX-sensitiven Nav-Kanälen. Nav1.8-Ströme hingegen besitzen eine langsamere Inaktivierungskinetik und der Kanal ist gegenüber TTX im μM -Bereich resistent. Die halbmaximale Aktivierungsspannung von Nav1.8 ist gegenüber den TTX-sensitiven Nav-Kanälen deutlich zu stärkeren Depolarisationen verschoben (Elliott & Elliott, 1993; Akopian *et al.*, 1996).

4.1 Verwendete Methodik

Das Expressionssystem der Wahl zum Studium von Nav-Kanälen sind normalerweise HEK293-Zellen. Diese besitzen nur sehr geringere endogene Natriumströme (He & Soderlund, 2010) und bieten so standardisierte Messbedingungen. Die heterologe Expression von Nav1.8 ist in diesen Zellen jedoch nur sehr begrenzt möglich und der zugrunde liegende Mechanismus erst ansatzweise bekannt. Funktionelle Untersuchungen an heterolog exprimierten Nav1.8-Kanälen sind bislang in DRG-Neuronen (Renganathan *et al.*, 2000), *Xenopus laevis* Oozyten (Akopian *et al.*, 1996) und neuronalen Zelllinien wie SH-SY5Y (Dekker *et al.*, 2005) und ND7/23 (Browne *et al.*, 2009) beschrieben wurden. Die Schwierigkeiten liegen dabei in der Gegenwart weiterer endogener Nav-Kanäle in DRG-Neuronen und Zelllinien neuronalen Ursprungs. Nav1.8 kann im Hintergrund dieser Zellen aufgrund seiner Resistenz gegenüber TTX isoliert betrachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Schaltverhalten von humanem Nav1.8 und Nav1.8 der Ratte nach heterologer Expression in Neuro-2A und ND7/23-Zellen vergleichend zu Nav1.4 in

Whole-Cell Patch-Clamp Experimenten untersucht. Es wurden vordergründig Neuro-2A-Zellen als Expressionssystem für Nav-Kanäle verwendet, welche bislang noch nicht als Expressionssystem für Nav1.8 beschrieben wurden. Die endogenen Natriumströme dieser Zellen können mit TTX (300 nM) vollständig maskiert werden, in Konzentrationen, die die Stromamplitude von Nav1.8 nicht beeinflussen ($IC_{50} = 60 \mu M$; Sivilotti *et al.* (1997)). In diesem somit standardisierten Messsystem ist eine Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten gewährleistet. Allerdings ist es erforderlich, den TTX-sensitiven Kanal Nav1.4 und alle Konstrukte mit der Domäne-1 von Nav1.4 mit der Punktmutation Y401S einzusetzen. Es handelt sich um den Austausch eines Tyrosin-Restes in der Porenschleife von Domäne-1 gegen ein Serin, wie es in Nav1.8 an orthologer Position enthalten ist. Diese Mutation ist ausreichend, um den IC_{50} des Kanals für TTX in den μM -Bereich zu verschieben (Leffler *et al.*, 2005). HEK293- und tsA201-Zellen besitzen ebenfalls endogene Natriumströme. Nach einer Arbeit von He and Soderlund (2010) findet man in 65% der HEK293-Zellen Einwärtsstrom-Amplituden von 100 – 400 pA. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit in nicht-transfizierten HEK293-Zellen gemessenen Strömen, entsprechend mittleren maximalen Einwärtsstromdichten von etwa 5 pA/pF. Diese endogenen Natriumströme besitzen eine gegenüber Nav1.8 schnelle Inaktivierungskinetik und lassen sich so von diesem unterscheiden. Da die endogenen Ströme von HEK293-Zellen nicht vollständig mit TTX maskiert werden können, wurden bei Messungen in HEK293-Zellen, außer zur Gewinnung der Expressionsstatistiken, Zellen mit weniger als 500 pA maximalem Einwärtsstrom verworfen.

4.2 Schaltverhalten von rekombinanten Nav1.8-Kanälen

hNav1.4 (P35499) und hNav1.8 (Q9Y5Y9.2) besitzen auf Aminosäureebene eine Sequenzübereinstimmung von knapp 60%. Dabei gehören vor allem die Transmembransegmente zu konservierten Bereichen, während die intra- und extrazellulären Schleifen zwischen den Nav-Kanal-Typen stärker variieren. Die am stärksten konservierten Bereiche (ohne N- und C-Terminus, Domäne 1-2 Schleife und Domäne 2-3 Schleife) besitzen eine Sequenzübereinstimmung von ca. 84% zwischen hNav1.8 und hNav1.4 (Goldin *et al.*, 2000), wodurch die Ausbildung unterschiedlicher biophysikalischer Eigenschaften und die Übernahme spezifischen physiologischen Rollen möglich wird.

Elliott and Elliott (1993) beschrieben erstmals TTX-resistente Ströme in DRG-Neuronen der Ratte, welche erst spät, d. h. bei starker Depolarisation der Zellmembran, aktivierten und schnell aus dem Zustand der schnellen Inaktivierung zurückkehrten, einem als *Repriming* bezeichneten Prozess. Später konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem diese Ströme vermittelnden Kanal um Nav1.8 handelt (Akopian *et al.*, 1996). Der Kanal wurde von Akopian *et al.* (1996) als neuer TTX-resistenter Nav-Kanal in DRG Neuronen (C-Fasern) der Ratte beschrieben und heterolog in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Der Kanal konnte kloniert und die Exon-

struktur aufgeklärt werden (Souslova *et al.*, 1997). Alle Studien von Nav1.8 in heterologen Systemen (Akiba *et al.*, 2003; John *et al.*, 2004; Dekker *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006) beschreiben die auffällige, bei etwa 20 mV stärkerer Depolarisation erfolgende Aktivierung, wie sie auch für den TTX-resistenten Strom in DRG-Neuronen im Vergleich zu den dort vorhandenen TTX-sensitiven Strömen gefunden wird (Elliott & Elliott, 1993).

Alle die Inaktivierung betreffenden Eigenschaften des Kanals, wie Inaktivierungskinetik, Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung und *Repriming*, unterliegen in Abhängigkeit vom Expressionssystem einer stärkeren Variabilität (Akiba *et al.*, 2003; John *et al.*, 2004; Dekker *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006). Möglicherweise kommt hier der Einfluss der β -Untereinheiten und eventuell weiterer akzessorischer Proteine auf die Stromamplitude, die Inaktivierungskinetik und die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zum tragen (Vijayaragavan *et al.*, 2004c).

In der vorliegenden Arbeit wurden Nav1.4 und Nav1.8 nach heterologer Expression in den neuronalen Expressionssystemen ND7/23 und Neuro-2A unter standardisierten Bedingungen charakterisiert und verglichen. Die ermittelten Schalteigenschaften dieser beiden Kanäle unterscheiden sich stark. Dies betrifft sowohl die Aktivierungsparameter, als auch die Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung und die Kinetik der Schaltprozesse. Der am stärksten ausgeprägte Unterschied ist die zuvor erwähnte, bekannte Aktivierung von Nav1.8 aller Spezies bei vergleichsweise starken Membrandepolarisationen. Es zeigte sich, dass der maximale Einwärtsstrom bei Nav1.8 erst bei ca. 20 mV stärkerer Depolarisation erreicht wird als dies bei Nav1.4 der Fall ist. Zudem verläuft die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bei Nav1.8 deutlich flacher als bei Nav1.4. Die in dieser Arbeit bestimmten Aktivierungsparameter von rekombinanten Nav1.8 Kanälen stimmen gut mit den für nativen Nav1.8 (Elliott & Elliott, 1993; Renganathan *et al.*, 2000; Renganathan *et al.*, 2001; Patrick Harty & Waxman, 2007) und rekombinanten Nav1.8 (Faber *et al.*, 2012) in DRG-Neuronen publizierten Daten überein. Daher kann man annehmen, dass die für heterolog exprimierte Nav1.8-Kanäle bestimmten Eigenschaften gut das Verhalten nativer Kanäle widerspiegeln.

Die Inaktivierungskinetik ist bei in Neuro-2A-Zellen exprimierten Nav1.8-Kanälen deutlich langsamer als bei Nav1.4. Die Anpassung von Stromspuren mit einem Hodgkin-Huxley-Modell ergab bei beiden Kanälen eine schnelle und eine langsame Inaktivierungs-Komponente, wobei beide Zeitkonstanten im Fall von Nav1.8 etwa um den Faktor 10 größer waren als bei Nav1.4. Zudem hat die schnelle Komponente bei Nav1.4 einen etwa 20% größeren Anteil an der Gesamt-Amplitude als bei Nav1.8. Auch in DRG-Neuronen zeichnet sich Nav1.8 durch seine langsame Inaktivierungskinetik aus. Elliott and Elliott (1993) geben eine Zeitkonstante für den Stromabfall von etwa 5 ms an, im Gegensatz zu 1 ms für den TTX-sensitiven Strom in DRG-

Neuronen der adulten Ratte. Ebenso werden für Nav1.8 im direkten Vergleich mit Nav1.2 um den Faktor drei größere Inaktivierungszeitkonstanten angegeben (Knapp *et al.*, 2012).

Als Vermittler der TTX-resistenten Ströme in DRG-Neuronen (Akopian *et al.*, 1996) verlässt Nav1.8 sehr viel schneller den Zustand der Inaktivierung als beispielsweise die den TTX-sensitiven Strom in DRG Neuronen vermittelnden Kanäle (Elliott & Elliott, 1993). Dib-Hajj *et al.* (1997) identifizierten daraufhin eine Tetrapeptid-Sequenz im S3S4 Bereich in Domäne-4 von Nav1.8, welche dieses schnelle *Repriming* vermitteln soll. Der Spannungssensor S4 in Domäne-4 ist für die Kopplung von Aktivierungsprozessen und schneller Inaktivierung verantwortlich (Chen *et al.*, 1996; Kuhn & Greeff, 1999). Die S3S4 Verbindung in Domäne-4 ist bei Nav1.8 allerdings länger als bei den anderen Nav-Kanälen, durch eine zusätzliche Sequenz bestehend aus den vier Aminosäuren Serin, Leucin, Glutaminsäure und Asparagin (SLEN). Wird das entsprechende Verbindungsstück in Nav1.4 an orthologer Position um diese Sequenz ergänzt (Nav1.4-SLEN), erfolgt die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung doppelt so schnell (Dib-Hajj *et al.*, 1997). Überraschenderweise geht damit eine Beschleunigung der Kinetik der schnellen Inaktivierung bei Nav1.4-SLEN gegenüber Nav1.4 einher (Dib-Hajj *et al.*, 1997). Die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung erfolgt bei rekombinant in Neuro-2A und ND7/23-Zellen exprimierten Nav1.8-Kanälen jedoch deutlich langsamer als bei Nav1.4. Bei einem Haltepotential von -120 mV erreichen zwar beide Kanäle eine vollständige Wiedererregbarkeit. Dies ist bei Nav1.8 jedoch erst nach etwa 100 ms, bei Nav1.4 bereits nach ca. 10 ms der Fall.

Insgesamt betrachtet weichen die in der Literatur verfügbaren inaktivierungsbezogenen Parameter von Nav1.8 in DRG-Neuronen stark von den in dieser Arbeit in rekombinanten Systemen bestimmten Parametern ab. Neben den zuvor beschriebenen Unterschieden ist insbesondere die Gleichgewichtsinaktivierung von Nav1.8 in DRG-Neuronen zu deutlich positiveren Potentialen verschoben. Beispielsweise geben Faber *et al.* (2012) für rekombinant in Maus-DRG-Neuronen exprimierte humane Nav1.8 Kanäle V_h Werte von -37 mV an, ebenso gilt dies für native TTX-resistente Ströme in DRG-Neuronen der Ratte (Elliott & Elliott, 1993). Die in dieser Arbeit bestimmten V_h -Werte für hNav1.8 gemessen an Neuro-2A und ND7/23-Zellen liegen bei Spannungen negativer als -70 mV.

Dies lässt vermuten, dass die Inaktivierung stärker als die Aktivierung von intrazellulären Faktoren wie dem Vorhandensein von β -Untereinheiten (Vijayaragavan *et al.*, 2004c) und anderen möglichen interagierenden Proteinen bestimmt wird, sowie von den Messbedingungen (Lösungen, Temperatur, Haltepotential) beeinflusst wird.

4.2.1 Nav1.4/Nav1.8 Domänen-Chimären

Basierend auf der molekularbiologischen Konstruktion von Domänenchimären aus Nav1.4 und Nav1.8 sollte eine Eingrenzung einzelner funktioneller Besonderheiten von Nav1.8 zu bestimmten molekularen Bereichen des Kanalproteins erzielt werden. Alle Chimären bilden bei Expression in Neuro-2A-Zellen funktionelle Proteine und zeigen deutlich ausreichende Expression mit Stromamplituden im Bereich bis zu einigen nA und zeichnen sich durch deutliche Unterschiede in ihrem elektrophysiologischen Verhalten aus. Insbesondere lässt sich aber eine starke Beteiligung der Domäne-2, zu geringerem Anteil auch der Domäne-1, an der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung feststellen. Die Strom-Spannungs-Beziehung der Chimäre 8844 ähnelt bereits stark der von rNav1.8, die halbmaximale Aktivierungsspannung V_m ist nur etwa 5 mV negativer als bei Nav1.8. Noch näher an V_m von Nav1.8 liegt die Chimäre 4844, sie besitzt die am weitesten zu stärkerer Depolarisation verschobene Strom-Spannungs-Beziehung. V_m von 8444 und 4448 liegen zwischen denen der Wildtypen, dabei liegt 8444 etwas näher an Nav1.8.

Hinweise auf eine besondere Rolle der vorderen Kanalhälfte für das Nav1.8-spezifische Aktivierungsverhalten enthalten die Studien von Yamaoka *et al.* (2009) und Knapp *et al.* (2012), welche eine Nav1.8-ähnliche Aktivierung bei Halb-Chimären aus Nav1.8 und Nav1.2 (2/8822, enthält außerdem einen Teil der Domäne-1 von Nav1.2) nach Expression in *X. laevis* Oozyten (Knapp *et al.*, 2012) bzw. Nav1.8 und Nav1.4 (8844) in HEK293-Zellen (Yamaoka *et al.*, 2009) erwähnen.

Im Gegensatz zur Aktivierung haben alle Domänenchimären in bestimmten Parametern von den Wildtypen abweichende Inaktivierungseigenschaften. Etwa zeigt als einzige Chimäre 4488 wie Nav1.8 eine unvollständige Inaktivierung. In dieser Chimäre sind die wichtigsten Faktoren der schnellen Inaktivierung, die Domäne-3/4 Schleife mit IFM-Motiv (Vassilev *et al.*, 1988; West *et al.*, 1992), der IFM-Rezeptor in S4S5 der Domäne-4 (Tang *et al.*, 1996; Kassmann *et al.*, 2008) und der C-Terminus (Deschênes *et al.*, 2001) von Nav1.8 enthalten. Man kann annehmen, dass diese Komponenten bei Nav1.8 eine funktionelle Einheit bilden und zusammen die unvollständige Inaktivierung vermitteln.

Die Bildung von Chimären rief allerdings auch unerwartete Resultate hervor, wenn die Eigenschaften der Chimären keinem der zugrunde liegenden Wildtypen entsprechen. Besonders auffällig ist die bei 4448 stark in negative Richtung, bzw. bei 8844 in positive Richtung, verschobene Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung verglichen mit Nav1.4 und Nav1.8. Als Ursache muss eine veränderte Kopplung der Domänen bei Schaltprozessen durch die Chimären-Bildung in Betracht gezogen werden. Bekannt ist auch, dass intrazelluläre Linker die Inaktivierung von Nav-Kanälen beeinflussen (West *et al.*, 1992; Smith & Goldin, 1996; Malik-Hall *et al.*, 2003), vermutlich aufgrund von Interaktionen mit intrazellulären Proteinen.

Knapp *et al.* (2012) beschrieben Chimären aus Nav1.2 und Nav1.8 nach Expression in Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Die dabei erzeugten Chimären (8822, 8882, 8/2288, 2288 und 2/8822) bilden mit Ausnahme von 2288 funktionelle Proteine. Eine entsprechende Beobachtung der Domänen-Inkompatibilität oder Expressionsminderung bei 4488 konnte in der hier vorliegenden Arbeit nicht gemacht werden.

Ferner stellten Knapp *et al.* (2012), wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, fest, dass sich die für Nav1.8 typische langsame Inaktivierungskinetik nicht mit der Domäne-3/4 Schleife allein auf Nav1.2 transferieren lässt. Das ist auch nicht zu erwarten, wenn man annimmt, dass zum einen mehrere Kanalbereiche an der Inaktivierung beteiligt sind. Zum anderen könnte die makroskopisch langsame Inaktivierung bei Nav1.8 auch eine Folge der langsamen Aktivierungskinetik sein, wenn man annimmt, dass die Inaktivierung hauptsächlich aus dem offenen Zustand erfolgt (*open-state inactivation* (Armstrong, 2006; Bähring & Covarrubias, 2011; Groome *et al.*, 2011)).

4.2.2 Isolierte Betrachtung der Aktivierung

Um objektiv die Aktivierungsparameter eines Nav-Kanals zu beurteilen, ist es notwendig, Aktivierungsprozesse von der Überlagerung mit schneller Inaktivierung zu trennen. Das bedeutet, die $O \rightarrow I$ (offen-inaktiviert) Übergänge auszuschalten, um makroskopisch Zugang zu den $C \rightarrow O$ (deaktiviert-offen) Übergängen zu erhalten. Hintergrund dafür ist, dass beispielsweise eine langsame Aktivierung gefolgt von schnellen Inaktivierungsprozessen einen ähnlichen makroskopischen Stromverlauf zeigen kann, wie das umgekehrte Modell mit schnellen Aktivierungsschaltübergängen gefolgt von einer langsamen Inaktivierung (Hille, 1978; Hille, 2001). Beide Prozesse können an Hand des makroskopischen Stromverlaufs nicht voneinander unterschieden werden, da sie sich nur im Anteil der offenen Kanäle bei Erreichen des Spitzenstromes unterscheiden (Hille, 1978; Hille, 2001).

Zur experimentellen Entfernung der schnellen Inaktivierung bei Nav-Kanälen bestehen verschiedene Möglichkeiten. Die schnelle Inaktivierung bei Nav-Kanälen kommt durch hydrophobe Interaktion des IFM-Motives in der Domäne-3/4 Schleife mit einem porennahen Rezeptorzustande (West *et al.*, 1992; McPhee *et al.*, 1995). Die Domäne-3/4 Schleife besteht aus etwa 60 Aminosäuren, von denen ein Fünftel basisch und damit potentielle Verdaustellen für proteolytische Enzyme sind (Vassilev *et al.*, 1988). Daher ist die enzymatische Entfernung des IFM-Inaktivierungs-Motives durch intrazelluläre Exposition der Kanalproteine mit Pronase (Armstrong *et al.*, 1973), Papain (Gonoi & Hille, 1987), α -Chymotrypsin (Valenzuela & Bennett, 1994) oder Trypsin (Clarkson, 1990) eine Möglichkeit, experimentell die schnelle Inaktivierung zu umgehen. Jedoch ist der enzymatische Verdau mit, je nach Enzym, > 30 min Wartezeit bis zur vollständigen Entfernung der Inaktivierung langwierig und experimentell aufwendig

(Gonoi & Hille, 1987). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das IFM-Motiv durch Mutation zu QQQ zu verändern (Hirschberg *et al.*, 1995; Grant *et al.*, 2000). Die hier verwendete Methode, ist der schnellste und experimentell am besten zu realisierende Weg, nämlich die Mutation des IFM-Motives zu IFC (Kellenberger *et al.*, 1997; Deschênes *et al.*, 1999). Bei Verwendung dieser Strategie besteht die Möglichkeit, Kontrolldaten derselben Zelle aufzunehmen und sie stellt den geringsten Eingriff in die Funktionsweise des Kanals und das intrazelluläre Milieu dar. Das eingefügte Cystein kann mit Cystein-spezifischen Reagenzien wie DTNP, bzw. dem nicht-membrangängigen Analogon DTNB, kovalent modifiziert werden (Schroll *et al.*, 2012), wodurch die vollständige Entfernung der schnellen Inaktivierung bei Nav1.8 wie hier gezeigt wurde in weniger als einer Minute möglich ist.

Alle Chimären wurden sowohl mit IFM-Motiv, als auch mit IFC-Motiv erzeugt. Ein wichtiger Vorteil der Methode ist, dass sich die Nav-IFC-Kanäle in ihren Schalteigenschaften kaum von den entsprechenden IFM-Kanälen unterscheiden. Lediglich die schnelle Inaktivierung ist unter Kontrollbedingungen etwas weniger vollständig (bis zu 10% persistenter Strom bei Nav1.8, 2% bei Nav1.4). Dies könnte auf eine verminderte hydrophobe Interaktion des IFC-Motives mit dem IFM-Akzeptor zurückzuführen sein, da Cystein weniger hydrophob ist als Methionin, oder auf Hintergrundoxidation im Zellmilieu aufgrund der erhöhten Sensitivität von IFC gegenüber Oxidation verglichen mit IFM beruhen.

Die Entfernung der Inaktivierung mittels DTNP erfolgt nahezu vollständig bei Nav1.8 (Ratte und Mensch), sowie den Chimären 8844, 8444 und 4844. Sowohl Nav1.4 als auch die Chimären 4488, 4484 und 4448 zeigen auch nach Erreichen des Gleichgewichts der DTNP-Reaktion einen Anteil verbliebener Inaktivierung in Form von maximal 30% Stromverlust bei Pulsdauern von 100 ms. Dies könnte auf Mechanismen der langsamen Inaktivierung zurückzuführen sein, da Valenzuela and Bennett (1994) beschreiben, dass die Entfernung der schnellen Inaktivierung die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt in die langsame Inaktivierung zumindest bei Nav1.5 erhöht. Für die hier angestrebten Experimente sollte dieser geringe Anteil Inaktivierung jedoch nicht hinderlich sein.

Gonoi and Hille (1987) zeigten, dass die Entfernung der schnellen Inaktivierung von endogenen Natriumkanälen in N18 Neuroblastom-Zellen mit Papain die langsame Aktivierungskinetik der in diesen Zellen exprimierten Nav-Kanäle Depolarisationen zwischen -50 mV und -30 mV sichtbar werden lässt. Die Spannungsabhängigkeit der maximalen Leitfähigkeit dieser Kanäle ist verglichen mit der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung in Gegenwart der Inaktivierung um 26 mV zu negativeren Potentialen verschoben (Gonoi & Hille, 1987). Außerdem steigt die maximale Stromamplitude mit zunehmendem Inaktivierungsverlust je nach verwendetem Enzym um einen Faktor zwischen 1.5 und 2 an (Gonoi & Hille, 1987).

Die Entfernung der schnellen Inaktivierung bei Nav1.8-IFC mittels DTNP führt zu einer Verringerung von V_m um ca. 10 mV bei rNav1.8 bzw. ca. 20 mV bei hNav1.8. Dem gegenüber tritt bei Nav1.4 kaum eine Verschiebung von V_m auf. Zudem fällt auf, dass nach Entfernung der Inaktivierung die Aktivierungskinetik bei Nav1.8 mit Zeitkonstanten im Bereich von einigen Millisekunden deutlich langsamer ist als bei Nav1.4. Die Anstiegsphase der Stromamplitude kann bei hNav1.8 über den gesamten Spannungsbereich mit einer einfach-exponentiellen Funktion angepasst werden. Bei Nav1.4 steigt scheinbar die Zahl der Zustandsübergänge mit der Spannung an, die Funktion wird mehrfach exponentiell. Das bedeutet, dass bei Nav1.8 die Aktivierung eines Spannungssensors so langsam ist, dass er den Gesamtprozess dominiert. Dieser Sensor ist S4 in Domäne-2, wie die an Hand der Chimäre 4844 bestimmten Daten zeigen.

Das Schaltverhalten von Nav1.8 wird somit stark durch die Inaktivierung beeinflusst. Daher hat jede Modulation der Inaktivierung einen stärkeren Einfluss auf den Gesamtstrom, verglichen mit anderen Nav-Kanälen. Die sonst vorhandene schnelle Inaktivierung täuscht eine bei starker Membran-Depolarisation erfolgende Aktivierung, sowie eine geringere Steilheit der Strom-Spannungs-Beziehung, vor. Dies führt zu einer reduzierten Stromamplitude unter Kontrollbedingungen und zu einem imposanten Anstieg der Stromamplitude bei Entfernung der schnellen Inaktivierung bei Nav1.8 um den Faktor 5 (rNav1.8) bzw. 15 (hNav1.8).

Nach Entfernung der Inaktivierung ist der Steigungsfaktor k_m bei Nav1.8 ähnlich wie bei Nav1.4. Dies spricht dafür, dass die gleiche Anzahl Ladungen während des Schaltvorganges bewegt werden, was wiederum der Erwartung entspräche, da die Nettoladung der S4 Spannungssensoren dieser Kanäle, abgesehen von den vorgelagerten Doppel-Lysinen in Domäne-2, gleich ist (Abb. 4-3), sowie auch die Anzahl der möglichen Gegenladungen in S2 (Abb. 4-4).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Domäne-2 von Nav1.8 in Form der Chimäre 4844, nicht nur unter Kontrollbedingungen die halbmaximale Aktivierungsspannung V_m auf Nav1.8-Werte verschiebt, sondern auch die Kinetik der Aktivierung auf genau den bei Nav1.8 bestimmten Phänotyp verändert. 4844 zeigt den bei den beiden Nav1.8 Kanälen vorhandenen einfach-exponentiellen Kurvenverlauf der Anstiegsphase des Stromes und gleiche Zeitkonstanten der Aktivierung, sowie einen sogar stärkeren Anstieg der Stromamplitude bei Entfernung der Inaktivierung als rNav1.8. Der Nav1.8-Aktivierungs-Phänotyp konnte somit durch ein Austauschen der Domäne-2 auf Nav1.4 übertragen werden.

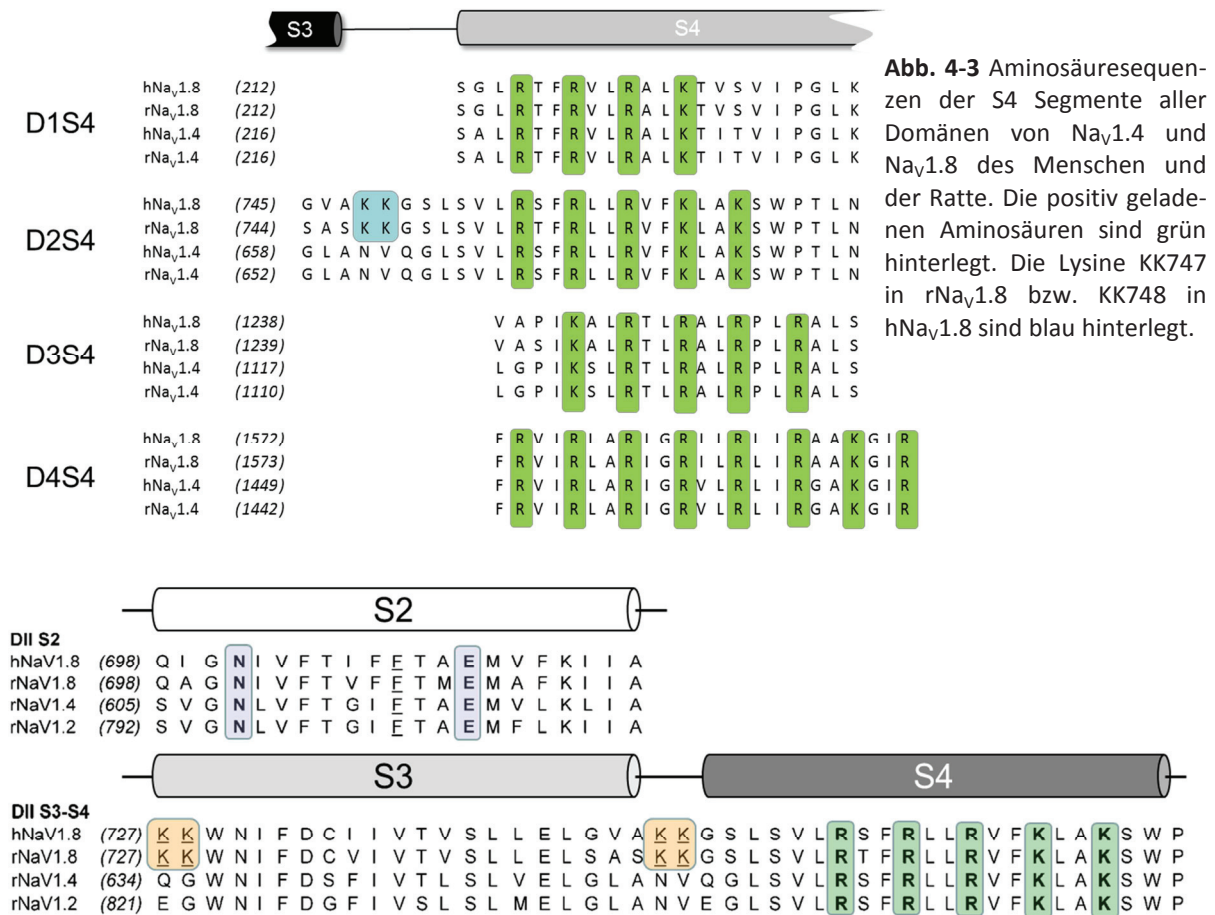


Abb. 4-3 Aminosäuresequenzen der S4 Segmente aller Domänen von Na_v1.4 und Na_v1.8 des Menschen und der Ratte. Die positiv geladenen Aminosäuren sind grün hinterlegt. Die Lysine KK747 in rNa_v1.8 bzw. KK748 in hNa_v1.8 sind blau hinterlegt.

Abb. 4-4 Aminosäuresequenzen von S2, S3 und S4 von Na_v1.2, Na_v1.4 und Na_v1.8. Hervorgehoben sind die Gegenladungen fungierenden Reste in S2, die beiden Na_v1.8-spezifischen Doppel-Lysine und die positiv geladenen Reste in S4.

4.2.3 Lysin-Doppelmotive in D2 von Na_v1.8 modulieren die Aktivierung

Na_v1.8-Kanäle aller Spezies besitzen im Bereich des Spannungssensor-Modules der Domäne-2 ein in der Familie der Na_v-Kanäle einzigartiges Motiv, bestehend aus zweimal zwei aufeinander folgenden Lysin-Seitenketten (KK726 und KK747 rNa_v1.8). Basierend auf der Sequenz-Lokalisation der Transmembran-Segmente und Schleifen (Akopian *et al.*, 1996), liegt das erste dieser Doppel-Lysine (KK726) im Bereich des Beginns von S3, das zweite Doppel-Lysin (KK747) befindet sich vor Beginn des S4-Segmentes, sechs Positionen vor dem ersten Arginin-Rest. Je nach Schaltmodell, befänden sich im Ruhezustand des Kanals beide Doppel-Lysine auf intrazellulärer Seite oder innerhalb der Membran (*Paddle-Modell*) bzw. das vordere auf intrazellulärer Seite und das hintere innerhalb der Membran, in Nähe der extrazellulären Seite (*Sliding-Helix-Modell*). Während in der aktivierten Position des Spannungssensors bei beiden Modellen das hintere Doppel-Lysin auf extrazellulärer Seite der Membran zu liegen käme (Abb. 4-5, 4-6).

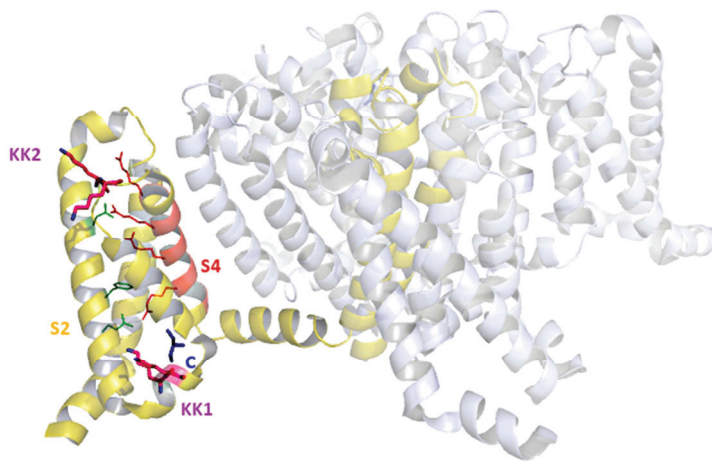


Abb. 4-5 Modell für die Raumstruktur eines Na_V-Kanals basierend auf der Kristallstruktur (2.7 Å) von NaVAb (Payandeh et al., 2011). Eine der vier Untereinheiten ist gelb dargestellt, entsprechend der Domäne—2 eukaryotischer Na_V-Kanäle, die übrigen Untereinheiten grau. Die vier Arginin-Seitenketten in S4 (rot) und die Gegenladungen in S2 (grün) sind gekennzeichnet. Die Na_V1.8-typischen Doppel-Lysine KK726 (KK1) und KK747 (KK2) wurden an entsprechender Position der Sequenz modelliert. Erstellung der Grafik mit Pymol, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.

Anhand der vorliegenden Daten zur Aktivierung von Na_V1.8 und der Chimäre 4844 nach Entkopplung der schnellen Inaktivierung kann über Mechanismus und molekulare Ursachen spekuliert werden. Es liegt scheinbar eine Stabilisierung des deaktivierten Zustandes des Sensors von Domäne-2 bei Na_V1.8 vor. Die folgenden Experimente sollten zeigen, ob diese Lysin-Motive als Ursache dafür in Betracht kommen.

Durch Mutation beider Doppel-Lysine im Hintergrund von Na_V1.8 zu den an orthologer Position in Na_V1.4 vorhandenen Aminosäuren, wird die halbmaximale Aktivierungsspannung V_m in Richtung V_m von Na_V1.4 verschoben. Die Verschiebung ist größer bei Entfernung des zweiten Doppel-Lysines und am stärksten bei Entfernung beider Doppel-Lysine. Der Effekt ist deutlich und qualitativ und quantitativ zwischen den Kanälen Na_V1.4 und Na_V1.8 in einer Isoform-spezifischen Weise übertragbar, was eine Rolle der Lysine in der Modulation des Aktivierungs-verhaltens anzeigt. Es kann allerdings nicht der volle Phänotyp der Chimäre 4844 allein durch die Lysin-Mutanten erzeugt werden, da das Spannungssensor-Modul (Chakrapani *et al.*, 2010) einer Domäne aus mehreren Komponenten besteht und vermutlich das gesamte Spannungssensor-Modul der Domäne-2 von Na_V1.8 für die Erzeugung des Phänotyps nötig ist.

Zudem bestehen Na_V-Kanäle aus vier nicht identischen Domänen, die einen unterschiedlichen Beitrag zur Anzahl der Schaltladungen leisten, wobei die Domänen-3 und 4 jeweils etwa 30% der Schaltladungen beitragen und die Domänen-1 und 2 gemeinsam 40% (Sheets & Hanck, 2002; 2005). Somit kann der Effekt zusätzlicher Ladungen in einem Spannungssensor immer nur als Effekt des Zusammenspiels aller Sensoren experimentell untersucht werden. Zum Vergleich beträgt die experimentell bestimmte Anzahl der verschobenen Schaltladungen beim Öffnen von Na_V-Kanälen 5 Elementarladungen bei hNa_V1.5 (Sheets & Hanck, 1995) bzw. 12 Elementarladungen bei rNa_V1.4 (Hirschberg *et al.*, 1995).

Um einen Hinweis auf die Position der Lysine in der Sekundärstruktur des Kanals und deren Orientierung in der Membran zu erhalten, wurden Toxine, welche mit dem Spannungssensor in Domäne-2 wechselwirken (Cestele *et al.*, 2001; Mantegazza & Cestele, 2005; Leipold *et al.*, 2007; Leipold *et al.*, 2012) von extrazellulärer Seite appliziert. Es zeigte sich, dass das μ O-Conotoxin MrVIA bei gleicher Konzentration einen stärkeren Block hervorruft, wenn die Lysine in $\text{Na}_v1.8$ entfernt werden. Dieser Effekt ist am stärksten ausgeprägt bei Entfernung beider Doppel-Lysine, wobei das vordere allein keinen Unterschied zum Wildtyp-Kanal bewirkt. Die Ursache kann räumlicher oder elektrostatischer Natur sein. In Kombination mit der Struktur von NaVAb (Payandeh *et al.*, 2011) und der Zuordnung der Sequenz zu Sekundärstrukturelementen bei $\text{Na}_v1.8$ (Akopian *et al.*, 1996) gibt dies einen Hinweis auf extrazelluläre Position des Doppel-Lysins KK747 in der deaktivierten Konformation (Abb. 4-5) des Spannungssensors und spräche damit gegen ein dem *Paddel-Modell* ähnliches Modell (Abb. 4-6).

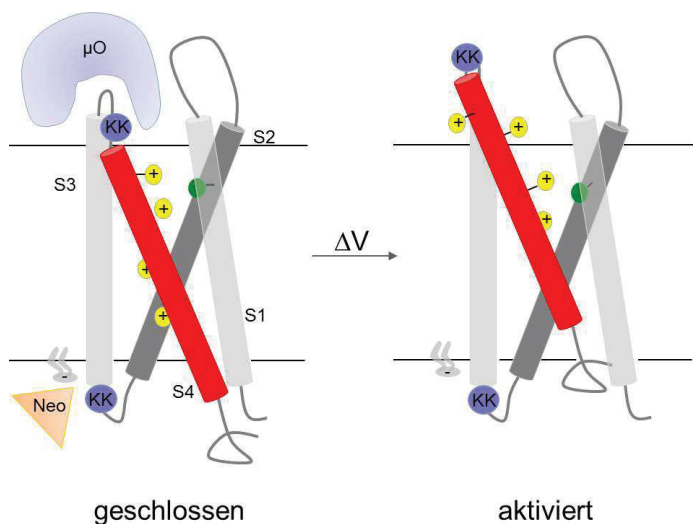


Abb. 4-6 Schematische Darstellung des Spannungssensor-Moduls S1-S4 mit positiven Ladungen in S4 (gelb), negativer Ladung in S2 (grün) und hypothetische Lage der Doppel-Lysine (KK, blau). Beim derartigen Modell behindert besonders KK747 die Interaktion mit μ O-Conotoxinen. KK726 interagiert auf intrazellulärer Seite mit negativen Ladungen von Membranphospholipiden, welche durch zytoplasmatisch applizierte große Kationen wie Neomycin gestört werden.

In Gegenwart von Neomycin ist die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von $\text{rNa}_v1.8$ -Wildtyp stärker zu weniger depolarisierenden Spannungen verschoben und die Steigung k_m ist stärker vermindert als bei der Mutante r8QGNV . Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei $\text{rNa}_v1.8$ -Wildtyp die positiven Ladungen der Lysine mit negativen Ladungen der Membranphospholipide interagieren können und die deaktivierte Position des Spannungssensors so stabilisieren. Dieses Experiment müsste mit r8QG und r8NV wiederholt werden, um eine Aussage bezüglich eines zu favorisierenden Bewegungsmodelles des Spannungssensors und der Lage der Lysine relativ zur Membran zu ermöglichen.

Einen Einfluss von negativen Ladungen in extrazellulärer Umgebung auf die Schalteigenschaften von Na_v -Kanälen zeigten Experimente zur Entfernung der negativ geladenen Sialinsäuren in der Porenschleife von Domäne-1 von $\text{Na}_v1.4$ (Bennett *et al.*, 1997; Bennett, 2002; Johnson *et al.*, 2004). Dabei bewirkte eine Entfernung der Sialinsäuren eine Verschiebung von V_m von $\text{Na}_v1.4$ um +15 mV, umgekehrt bewirkte das Hinzufügen von Sialinsäuren an der β_1 -

Untereinheit eine Verschiebung zu negativeren Potentialen (Bennett, 2002; Johnson *et al.*, 2004). Bennett *et al.* (1997) führten dies darauf zurück, dass die negativ geladenen Sialinsäuren das elektrische Feld, welches die Spannungssensoren spüren, ändern. Die Platzierung von zusätzlichen negativen Ladungen im extrazellulären Bereich (Sialinsäuren) sollte dann einen gegenteiligen Effekt haben, wie positive Ladungen im intrazellulären Bereich (Neomycin), was den Beobachtungen in dieser Arbeit nahe kommt und auch für eine Lage der Lysine im elektrischen Feld der Membran sprechen könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Doppel-Lysine in Domäne-2 am Schalten von Nav1.8-Kanälen beteiligt sind, jedoch nur einen Teil zum gesamten Verständnis des Mechanismus beitragen. Langfristig sollte das Ziel die Entwicklung eines Schaltmodells sein, um Kopplung von Aktivierungs- und Inaktivierungsprozessen bei Nav1.8 beschreiben zu können.

4.3 Molekulare Pharmakologie von Nav1.8

4.3.1 Aktivierungsmodifizierende Toxine

Ekberg *et al.* (2006) beschrieben das μ O-Conotoxin MrVIB als spezifischen Blocker für Nav1.8-Kanäle exprimiert in *Xenopus laevis* Oozyten, da Nav1.8 von geringeren Konzentrationen blockiert wird als Nav1.2, Nav1.3, Nav1.5 und Nav1.7. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Nav1.4 ähnlich empfindlich für einen Block durch MrVIA ist wie Nav1.8 und somit Nav1.8 kein spezifisches Ziel von μ O-Conotoxinen darstellt.

Des Weiteren ist bekannt, dass die Subtypspezifität der μ O-Conotoxine durch die Porenschleife der Domäne-3 von Nav-Kanälen vermittelt wird (Zorn *et al.*, 2006) und dass die Reduktion der Na⁺-Leitfähigkeit auf der Behinderung der Aktivierung des Spannungssensors in Domäne-2 beruht (Leipold *et al.*, 2007). Alle bisherigen Studien zur Sensitivität von Nav1.8 gegenüber μ O-Conotoxinen wurden an *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. In dieser Arbeit wurden erstmals Experimente mit Säugerzellen unternommen. Nav1.8-Kanäle in Neuro-2A-Zellen werden sehr effektiv von μ O-MrVIA blockiert. Dabei ist der Block durch 400 nM MrVIA mit etwa 40% bei hNav1.8 schwächer ausgeprägt als bei rNav1.8 (60%). Die Sensitivität von rNav1.8 ist dabei etwas geringer als die von rNav1.4. Dafür spielt die Porenschleife in Domäne-3 keine Rolle (44(p8)4), eher sind die Doppel-Lysine in Domäne-2 beteiligt, wie zuvor beschrieben. Auch Knapp *et al.* (2012) beschreiben, dass Domäne-2 den MrVIB-Phänotyp von Nav1.8 auf Nav1.2 überträgt. Möglich ist, dass Toxine die mit dem Spannungssensor in Domäne-2 interagieren, aufgrund der langsamen Aktivierung bei Nav1.8 schlechter wirken. Beispielsweise beschrieben Sokolov *et al.* (2008), das Pro-Tx-II den Spannungssensor von Domäne-2 behindert und dabei bevorzugt auf schnell bewegte Schaltladungen reagiert.

4.3.2 Inaktivierungsmodifizierende Toxine

Site-3-Toxine (α -Lqh2 aus *Leiurus quinquestriatus hebraeus* und δ -SVIE aus *Conus striatus*) interagieren mit der extrazellulären Schleife zwischen S3 und S4 in Domäne-4 (Leipold *et al.*, 2004; Leipold *et al.*, 2005) von Nav-Kanälen, α -Skorpiontoxine außerdem mit der Porenschleife von Domäne-1 (Rogers *et al.*, 1996; Leipold *et al.*, 2005; Heinemann & Leipold, 2007; Campos *et al.*, 2008). Beide Toxinklassen behindern die Aktivierung des Spannungssensors in Domäne-4 und damit die Kopplung der Aktivierung an die Inaktivierung des Nav-Kanals (Chen *et al.*, 1996; Chanda & Bezanilla, 2002; Campos *et al.*, 2008). Es scheint somit einen offenen Zustand des Kanals zu geben, ohne notwendige Aktivierung von S4 in Domäne-4 (Chanda & Bezanilla, 2002).

Nav1.8 ist nicht empfindlich für α - und δ -Conotoxine, hier Lqh2 und SVIE. Der Kanal verhält sich hinsichtlich der Domänenbeteiligung für beide Toxine ähnlich. Die vordere Kanalhälfte von Nav1.8 für sich (8844) ist leicht sensitiv, die hintere (4488) unempfindlich. Die Domäne-1 von Nav1.8 allein (8444) genügt, um die Empfindlichkeit gegenüber Lqh2 oder SVIE deutlich herabzusetzen. Überraschenderweise ist auch Domäne-3 (4484) unempfindlich, wobei die Porenschleife (44(p8)4) nicht die Ursache zu sein scheint. Neben den bekannten Interaktionsstellen in Domäne-4 und Domäne-1 von Nav-Kanälen (Rogers *et al.*, 1996), zeigt diese Arbeit, dass bei Nav1.8 die Domänen-1, 3 und 4 für die Toxinwirkung wichtig sind.

Bekannt ist, dass das Einfügen einer Tetrapeptidsequenz (SLEN) in S3-S4 von Domäne-4, wie sie in Nav1.8 auftritt, ausreichend ist, um Nav1.4 unempfindlich gegen das Gift von *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Saab *et al.*, 2002) zu machen. Die in dieser Arbeit vorgenommenen Modifikation der Domäne-4 in der Chimäre 4448 durch Veränderung dieses Motivs (4448-EN, 4448+V) hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber 2 μ M SVIE, was auf einen anderen Mechanismus hinweist. Durch diese beiden Modifikationen wird auch eine hydrophoben Triade (YFV) gebildet, wie sie als Interaktionsmotiv für δ -SVIE postuliert wurde (Leipold *et al.*, 2005; Heinemann & Leipold, 2007). Da weder 4448-EN noch 4448+V empfindlich gegenüber SVIE ist, scheint ein solches Motiv nicht ausschlaggebend die Empfindlichkeit zu vermitteln.

4.4 Modulation des Nav1.8-Gesamtstromes durch Oxidation

Die elektrische Aktivität von Neuronen wird *in vivo* stark reguliert, wobei neben post-translationalen Modifikationen auch ROS und dadurch ausgelöste oxidative Modifikationen eine wichtige Rolle spielen. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind allerdings erst teilweise bekannt und verstanden. Die Stärke der Modifikationen ist unter anderem abhängig vom Oxidations-Abwehr-Status der Zelle (Berlett & Stadtman, 1997), welcher durch Redox-Puffer-Systeme, wie z. B. den Methionin-Sulfoxid-Reduktasen (MSR) (Weissbach *et al.*,

2002; Hansel *et al.*, 2005) bestimmt wird. Für Veränderungen des ROS-Vorkommens in Zellen reichen beispielsweise schon Schwankungen im Glukose-Metabolismus aus: Sowohl Hypo-Glykämie, als auch Hyper-Glykämie können zur Erhöhung der ROS-Spiegel in der Zelle führen (Zhang *et al.*, 2003).

Oxidative Modifikationen von Proteinen sind eingebunden in Signalwege von degenerativen Prozessen und spielen eine Rolle bei Alterungsvorgängen von Organismen (Berlett & Stadtman, 1997). Die Oxidation von intrazellulären Proteinen tritt *in vivo* sowohl unter physiologischen Bedingungen als normaler Effekt des Zellstoffwechsels, als auch unter pathophysiologischen Prozessen, wie bei Entzündungen, auf (Levine *et al.*, 1999; Hoshi & Heinemann, 2001; Luo & Levine, 2009). Der Modifikation von Proteinfunktionen besonders bei in Signalprozessen beteiligten Proteinen wie den spannungsgesteuerten Ionenkanälen kommt dabei eine besondere Rolle zu (Hool, 2006; Hsieh, 2008; Kassmann *et al.*, 2008; Kolbe *et al.*, 2010).

Experimentell wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der ROS-Sensitivität das milde Oxidationsmittel Chloramin-T (ChT) eingesetzt. Die Empfindlichkeit von Proteinen gegenüber ChT basiert auf Oxidation von Methionin zu Methionin-Sulfoxid (Su *et al.*, 2007). Dabei zeichnet sich ChT bei neutralen und leicht alkalischen pH-Werten durch eine hohe Spezifität für Methionin aus, im sauren Bereich werden auch andere Aminosäuren wie Tryptophan oxidiert (Shechter *et al.*, 1975).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die schnelle Inaktivierung von Nav1.8-Kanälen von Mensch und Ratte schon bei etwa einer Größenordnung niedrigeren Konzentrationen von ChT (10 μ M) reagiert, als dies bei Nav1.4 der Fall ist. Diese besondere Empfindlichkeit von Nav1.8 gegen Oxidationsmittel ist in mehrerlei Hinsicht eine interessante Beobachtung. Wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, ist Nav1.8 neben DRG-Neuronen (Akopian *et al.*, 1996) auch in intrakardialen Neuronen exprimiert, nicht jedoch in Kardio-Myozyten (Facer *et al.*, 2011; Verkerk *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). Basierend auf einem Modell von Cannon *et al.* (1993), in welchem die verminderte Inaktivierung bei Nav-Kanälen repetitive Depolarisationen und Paralyse bewirkt, könnte eine derartige Modifikation von Nav1.8 nicht nur die Schmerzschwelle herabsetzen, sondern auch kardiale Aktionspotentiale verändern mit Auswirkungen auf die Aktivität des Herzmuskels. Solche Effekte könnten im Rahmen von Entzündungsprozessen und Ischämie/Re-Perfusion beobachtet werden. Ein derart empfindlicher Kanal wie Nav1.8 könnte mit seiner Reaktion auf sehr geringe ROS-Konzentrationen eine Rolle als zellulärer Sensor für Umstellungen des Zell-Stoffwechsels übernehmen.

Kassmann *et al.* (2008) beschreiben umfassende Untersuchungen zur Oxidationssensitivität spannungsabhängiger Nav-Kanäle. Besonders wichtig für die Sensitivität der Inaktivierung von

Nav-Kanälen auf Oxidation ist das bekannte Methionin im IFM-Motiv (Rohl *et al.*, 1999) und die beiden Methionin-Reste des IFM-Rezeptors in der S4-S5 Schleife der Domäne-4 (Tang *et al.*, 1996; McPhee *et al.*, 1998). Die Mutation dieser Methionin-Reste zu Leucin bewirkt jedoch keine vollständige Unempfindlichkeit des Kanals gegen Oxidation. Für einen vollständigen Verlust der Inaktivierung ist die Oxidation verschiedener Methionin-Reste erforderlich (Kassmann *et al.*, 2008). Selbst Nav1.8_IFL ist nicht unempfindlich gegenüber extrem geringen Konzentrationen von ChT. Alle Domänenchimären aus Nav1.4/Nav1.8 sind dabei empfindlicher als rNav1.4 und ähnlich empfindlich wie rNav1.8. Nach Smith and Goldin (1997) beeinflusst eine Modifikation der Domänen die Interaktion des IFM-Motivs mit einer Rezeptorstelle, eine Modifikation am Inaktivierungsmotiv aber hat Einfluss auf die Interaktion mit allen Rezeptorstellen. Daher könnten IFM-Rezeptorstellen bei Nav1.8 empfindlicher auf Oxidation reagieren, als bei Nav1.4.

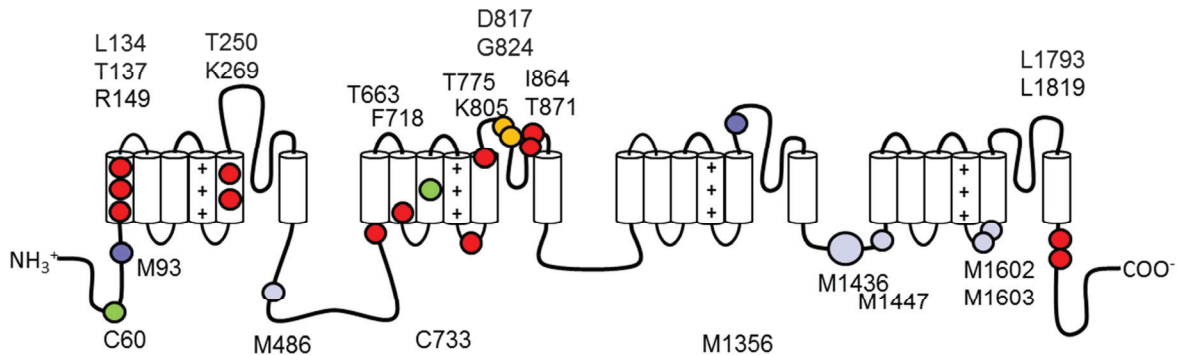


Abb. 4-7 Sekundärstruktur-Modell von Nav1.8 mit Markierung der nicht konservierten Met und Cys in Nav1.8-Kanälen (Nummerierung für rNav1.8), sowie bekannten und für die oxidative Regulation von Nav-Kanälen wichtigen Met (grau). rot: konservierte Met, die Nav1.8-Kanälen gegenüber anderen Nav's fehlen; orange: konservierte Cys, die Nav1.8 fehlen; grün: zusätzliche Cys bei Nav1.8; dunkelblau: zusätzliche Met in Nav1.8 Kanälen.

Man könnte nun annehmen, dass der Kanal Nav1.8 exponierte Methionin-Reste besitzt, die in anderen Nav-Kanälen nicht vorhanden sind und eine Rolle als IFM-Rezeptor spielen. Eine solche Hypothese kann anhand der Sequenzvergleiche nicht gestützt werden. Nav1.8 besitzt nur wenige Cysteine und Methionine, die spezifisch für diesen Kanal sind (Abb. 4-7). Im Gegenteil ist eine ganze Reihe von Methioninen und Cysteinen innerhalb der Familie der Nav-Kanäle konserviert, fehlen jedoch bei Nav1.8 (Abb. 4-7). Möglicherweise nehmen diese konservierten Methionine bei anderen Nav-Kanälen eine Schutzfunktion als ROS-Fänger ein (Levine *et al.*, 1999; Luo & Levine, 2009). Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Vermutung, dass die außerordentliche Sensitivität von Nav1.8 nur durch das diesem Kanal eigene spezielle Schaltverhalten ermöglicht wird. Zum einen ist die Inaktivierung von Nav1.8 in rekombinanten Systemen nie ganz vollständig, was möglicherweise die Zugänglichkeit für Oxidantien zu den Zielstellen der Modifikation erleichtert. Des Weiteren könnten aufgrund der langsamen Aktivierung und dem stark von der Inaktivierung bestimmten Schaltverhalten, Modifikationen der Inaktivierung bei

Nav1.8 einen außerordentlich starken Einfluss auf den Phänotyp der Stromantworten haben. Möglicherweise ist die Modifikation auf molekularer Ebene bei den anderen Nav-Kanälen ebenso ausgeprägt, führt aber nicht zu einer Änderung des makroskopischen Stromes.

Die Besonderheit der Reaktion auf oxidative Stimuli bei Nav1.8 ist die in zwei Phasen erfolgende Modulation des Stromes. Zunächst beobachtet man eine spannungsabhängige Reduktion des Spitzenstromes, gefolgt von einem Verlust der schnellen Inaktivierung gekoppelt mit einem Anstieg des Spitzenstromes. Dadurch wird der Gesamtstrom stark modulierbar. Interessanterweise ist der anfängliche Block bei geringeren Depolarisationen stärker ausgeprägt (60% bei -20 mV, 40% bei 10 mV). Das heißt, bei Spannungen mit extrem langsamer Aktivierung ($\tau_m \approx 10$ ms) ist die Reduktion des Spitzenstromes am stärksten. Dies könnte ein Hinweis auf die Bedeutung des Schaltmechanismus für diesen Effekt sein. Für einen Schalteffekt könnte sprechen, dass die Sensitivität der schnellen Inaktivierung gegenüber 10 μ M ChT bei humanem Nav1.8 und Nav1.8 der Ratte gleich ist, der Block bei hNav1.8 jedoch etwas stärker ausfällt. Möglicherweise ist dies eine Folge der, wie zuvor gezeigt, bei hNav1.8 noch langsameren Aktivierung. Die Tatsache, dass der Block bei rNav1.8_IFL nur ein Drittel so schnell, jedoch genauso stark, eintritt wie bei rNav1.8_IFM lässt eine Beteiligung des Inaktivierungsmotivs vermuten, die aktuell nicht erklärbar ist. Eine Beteiligung von Schwefel-haltigen Aminosäuren in der Pore wie bei Nav1.5 (Kassmann *et al.*, 2008) kann bei Nav1.8 ausgeschlossen werden. Die Chimären aus Nav1.4/Nav1.8 zeigen die Ursache des Blocks in Domäne-1 an. Die Domäne-1 von Nav1.8 besitzt ein nicht konserviertes Methionin und ein nicht konserviertes Cystein (Abb. 4-7). Untersuchung der Chimäre 4n8888 könnte hier eine Bedeutung dieser Reste anzeigen. Interessanterweise tritt der Block nur bei Applikation von ChT, nicht bei DTNP oder DTNB auf. Dies könnte zum einen daran liegen, dass ein Methionin modifiziert wird und nicht Cystein. Möglich ist auch, dass die modifizierte Stelle ein Cystein ist, aber für die kovalente Modifizierung durch das große DTNP-Molekül nicht zugänglich ist.

Die molekularen Ursachen des Nav1.8-Oxidationsverhaltens sind damit im Ansatz gezeigt. Es scheint eine sehr komplexe Reaktion zu sein, die möglicherweise erst nach Aufklärung des kompletten Schaltmodells erklärt werden kann. Hypothetisch könnte man eine Änderung der Schaltmodi (z. B. Luo *et al.* (2007) anhand von Kardiomyozyten) bei Oxidation mit einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung auf der Spannungsachse zuerst zu stärkeren Depolarisationen (Stromreduktion), dann zu weniger depolarisierenden Spannungen (Stromzunahme bei Inaktivierungsverlust), annehmen.

4.5 Unterschiede zwischen $\text{Na}_v1.8$ des Menschen und der Ratte

Die Expressionsniveaus von $\text{Na}_v1.8$ der Ratte und des Menschen unterscheiden sich kaum voneinander und zwischen den Expressionssystemen Neuro-2A und ND7/23. Besonders hinsichtlich ihres Inaktivierungsverhaltens sind jedoch Differenzen festzustellen. Insgesamt stimmen die Beobachtungen gut mit den von Browne *et al.* (2009) für $\text{hNa}_v1.8$ und $\text{rNa}_v1.8$ in ND7/23-Zellen publizierten Resultaten überein.

Als überraschende Beobachtung erwies sich, dass nach Entfernung der schnellen Inaktivierung mittels DTNP die Aktivierungskinetik bei $\text{hNa}_v1.8$ noch deutlich langsamer ist als bei $\text{rNa}_v1.8$, was auch im gegenüber $\text{rNa}_v1.8$ noch deutlich verstärkten Anstieg des Spitzenstromes bei Entfernung der schnellen Inaktivierung zum Ausdruck kommt. Die Domäne-2 von $\text{hNa}_v1.8$ könnte demnach langsamer aktivieren als bei $\text{rNa}_v1.8$. Kombiniert mit der Beobachtung, dass Modifikationen im S4-Segment der Domäne-2, welche diesen Sensor „schneller“ und empfindlicher für $\mu\text{O-Conotoxine}$ zu machen scheinen (r8QGNV), wäre dies eine mögliche Erklärung für die gegenüber $\mu\text{O-MrVIA}$ höhere Empfindlichkeit von $\text{rNa}_v1.8$ verglichen mit $\text{hNa}_v1.8$.

Aus den Unterschieden zwischen $\text{hNa}_v1.8$ und $\text{rNa}_v1.8$ könnten sich Konsequenzen für die Eigenschaften von Aktionspotentialen in DRG-Neuronen von Mensch und Ratte ergeben. Die unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften beispielsweise hinsichtlich der Wirkung von $\mu\text{O-MrVIA}$ sollten bei der Entwicklung von auf $\text{Na}_v1.8$ zielenden Analgetika beachtet werden.

4.6 Expression von $\text{Na}_v1.8$ in nicht-neuronalen Zellen

Die mittleren Einwärtsstromdichten bei $\text{Na}_v1.8$ -exprimierenden Zellen betragen selbst nach Expression in neuronalen Zellen, unter Voraussetzung äquivalenter Transfektionsbedingungen, nur etwa ein Viertel der von $\text{Na}_v1.4$ erzielten Stromdichten. Eine mögliche Ursache dafür könnte im Aktivierungsschaltverhalten des Kanals begründet liegen. Der Anstieg des Spitzenstromes nach Entfernung der schnellen Inaktivierung deutet darauf hin, dass wegen der Kopplung von langsamer Aktivierung und schneller Inaktivierung nur ein Bruchteil der verfügbaren Kanäle am maximalen Einwärtsstrom geöffnet ist.

Die Expression von rekombinantem $\text{Na}_v1.8$ gemessen an Einwärtsstromdichten ist in neuronalen Zellen um den Faktor >10 ausgeprägter als in HEK293-Zellen und ausreichend um alle *Whole-Cell Patch-Clamp* Experimente in diesen Zellen durchzuführen. Jedoch wird der Kanal $\text{Na}_v1.8$ in HEK293-Zellen ebenfalls gebildet. Dies konnte mit Hilfe der $\text{hNa}_v1.8_IFC$ Mutation nach Entfernung der schnellen Inaktivierung durch DTNP gezeigt werden. Der folgende starke Anstieg der Stromamplitude bewirkt, dass man auch deutlich die $\text{Na}_v1.8$ vermittelten Ströme (mit Amplituden um 1 nA) messen kann. Auch Fusionskonstrukte von $\text{Na}_v1.8$, sowohl des Men-

schen als auch der Ratte, mit EGFP zeigten im Fluoreszenzmikroskop die Bildung des Proteins an. Aus diesen Aufnahmen allein kann jedoch nicht sicher auf eine Membranlokalisation des Kanals geschlossen werden, es könnte sich schlicht um an den Rand gedrängtes Zytoplasma handeln, wodurch ein Defekt im Membrantransport dieses Nav-Kanaltyps (Zhao *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010) nicht ausgeschlossen werden kann. Für einen derartigen Nachweis wäre eine spezifische Membranfärbung (z. B. mit Alexa Fluor® 633 konjugiertem Weizenkeim-Agglutinin, Invitrogen) nötig, um im *Laser Scanning* Mikroskop eine Ko-Lokalisation von Nav1.8-EGFP und Membranfarbstoff nachweisen zu können. Da aber auch in HEK293-Zellen exprimierte Nav1.4-Kanäle geringere Stromdichten liefern als in Neuro-2A-Zellen, handelt es sich möglicherweise auch um ein Resultat unterschiedlicher Nav-Proteinbildungskapazitäten bei neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien.

Dennoch scheinen Mechanismen zu existieren, die in nicht-neuronalen Zellen die Bildung von funktionellen Nav1.8 Kanälen behindern. Zhang *et al.* (2008) beschrieben, dass Nav1.8 in der intrazellulären Schleife zwischen den Domänen-1 und 2 ein ER-Retentionssignal enthält, welches durch Interaktion mit der β_3 -Untereinheit maskiert werden könne. Dies führt zu einer höheren Dichte von Nav1.8-Protein in der Zellmembran (Zhang *et al.*, 2008). Die Ko-Expression von humaner β_3 -Untereinheit zusammen mit hNav1.8 bewirkte jedoch keine Steigerung der Nav1.8 Strom-Amplituden in HEK293-Zellen oder *Xenopus laevis* Oozyten, ebenso wenig wie die Entfernung des ER-Retentionssignals in Form der Mutante hNav1.8-e11.

Es gelang Choi *et al.* (2004) die Expression von Nav1.8 in ND7/23-Zellen zu steigern, indem sie den C-Terminus von Nav1.8 gegen den Nav1.4 C-Terminus austauschten. Umgekehrt konnte die Expression von Nav1.4 mit Einbringen des Nav1.8 C-Terminus vermindert werden (Choi *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von 8888c4 Chimären auch in den nicht-neuronalen HEK293-Zellen möglich ist. Weiterführend zur Arbeit von Vijayaragavan *et al.* (2004a) (C-Terminus Chimären aus Nav1.7/Nav1.8 in tsA201-Zellen), gelang es außerdem, den Anteil der Nav1.4-Sequenz im C-Terminus weiter zu vermindern. Jede der C-Terminus-Chimären wird in HEK293-Zellen geringer exprimiert als 8888c4. Die Regulation über den C-Terminus stellt sich somit nicht als einfacher Schwarz-Weiß-Effekt dar. Dennoch scheint ein Sequenzstück, bestehend aus zehn Aminosäuren Sequenz-Unterschied (Cmin3), wichtig zu sein. In Anlehnung an die Struktur des Nav-Kanal C-Terminus (Cormier *et al.*, 2002) befindet sich diese Region im Bereich der Helix 6 des EF-Hand Motivs im C-Terminus und schließt das sogenannte IQ-Motiv mit ein. Dieses Motiv soll über die Interaktion mit Calmodulin eine Regulation der Nav1.8 Expression ermöglichen (Choi *et al.*, 2006). Da Veränderungen am C-Terminus den Prozess der schnellen Inaktivierung bei Nav-Kanälen beeinflussen

(Deschênes *et al.*, 2001; Mantegazza *et al.*, 2001), ist auch denkbar, dass es dadurch bei Nav1.8 zur Steigerung der Strom-Amplitude kommt.

Interessanterweise bildet die Chimäre 4444c8 in HEK293-Zellen funktionelle Kanäle aus. Der C-Terminus von Nav1.8 allein verhindert also nicht die Ausbildung funktioneller Kanäle. Einer Arbeit von Lee and Goldin (2009) zu Folge sind auch die Transmembransegmente von Nav1.8 an der Regulation der Expressionsstärke beteiligt. Zusammen mit der beschriebenen Rolle der Domäne-1/2 Schleife für die Membranintegration des Kanals (Zhang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010), ist die Bildung funktioneller Nav1.8 Kanäle ein stark regulierter Prozess, welcher nicht auf einzelne Aminosäuren im C-Terminus zurückgeführt werden kann.

Auffällig sind die Unterschiede der Inaktivierungskinetik bei den C- und N-Terminus Chimären zum Nav1.8 Wildtyp-Kanal. Auch die Parameter der Gleichgewichtsinaktivierung unterscheiden sich deutlich von Nav1.8, während die Aktivierungsparameter von Mutationen im C- und N-Terminus unberührt bleiben. Dies passt zur beschriebenen Rolle des Nav-Kanal C-Terminus für die schnelle Inaktivierung (Deschênes *et al.*, 2001; Mantegazza *et al.*, 2001). Die besonders langsame Inaktivierungskinetik im Fall von 4n8888c4 spricht möglicherweise für Interaktionen von N- und C-Terminus des Kanals (Zhang *et al.*, 2000).

4.7 Spleißvarianten von hSCN10A

4.7.1 Exon 11 -*Skipping*

Nav1.8+e11 und Nav1.8-e11 erreichten beide in den neuronalen Zelllinien Neuro-2A und ND7/23 vergleichbare Natrium-Stromdichten. Die beiden Nav1.8-Isoformen bilden demnach beide funktionelle Proteine, wobei der Verlust eines großen Teiles der Domäne-1/2 Verbindung demnach keinen offensichtlichen Einfluss auf die Expressionsstärke in neuronalen Zellsystemen hat. Die Kanäle unterschieden sich zudem überraschenderweise in keinem der Schaltparameter.

Bei Nav1.7 Kanälen ist ebenfalls eine Spleißvariante bekannt, welche zu einer um 11 Aminosäuren verlängerten Exon 11 Sequenz bei diesem Kanal führt (Chatelier *et al.*, 2008). Exon 11 kodiert bei Nav1.7 ebenfalls einen Bereich der Domäne-1/2-Schleife, jedoch einen verglichen mit Nav1.8 weiter *downstream* liegenden Sequenzabschnitt (Chatelier *et al.*, 2008; Farmer *et al.*, 2012). Nach Expression in HEK293 und tsA201-Zellen zeigen beide Nav1.7 Isoformen ebenfalls keine funktionellen Unterschiede (Chatelier *et al.*, 2008), erst nach Koexpression mit der β_1 -Untereinheit verschiebt sich die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung bei der langen Variante (Nav1.7_11L) etwa 15 mV zu positiveren Potentialen, bei der kurzen Variante (Nav1.7_11S) nur etwa 5 mV (Farmer *et al.*, 2012). Ein analoger Effekt auf Nav1.8 wäre bei Ex-

pression in ND7/23-Zellen vermutlich nicht sichtbar, da diese endogene Nav β_1 und β_3 Untereinheiten exprimieren (John *et al.*, 2004).

Faber *et al.* (2012) beschreiben eine Mutation in hNav1.8, L554P, welche sich innerhalb der von Exon 11 kodierten Sequenz befindet und durch Austausch eines Leucins gegen ein Prolin zur Bildung eines PPP Motivs führt. Die elektrophysiologische Untersuchung der hNav1.8_L554P Kanäle nach Transfektion von Maus-DRG Neuronen zeigte keine Abweichung vom Wildtyp bezüglich der Aktivierung und der Gleichgewichtsinaktivierung (Faber *et al.*, 2012). Allerdings scheint die Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung bei L554P Kanälen schneller als bei Wildtyp-Kanälen zu erfolgen, was auch in größeren Rampen-Strömen zum Ausdruck kommt (Faber *et al.*, 2012). hNav1.8-e11 und hNav1.8+e11 lassen bei Untersuchung in Neuro-2A-Zellen keinen derartigen Effekt erkennen. Da jedoch die Inaktivierungseigenschaften des Kanals stark vom Expressionssystem abhängen – insbesondere ist die Spannung der halbmaximalen Inaktivierung um -35 mV verschoben und das *Repriming* deutlich langsamer – kann möglicherweise ein geringer Unterschied im Phänotyp der beiden Isoformen nur bei Expression in DRG-Neuronen sichtbar sein.

Die intrazelluläre Schleife zwischen den Domänen-1 und 2 variiert stark zwischen den einzelnen Nav-Kanälen. Allein die Länge reicht von etwa 130 Aminosäuren bei Nav1.4 bis ca. 330 Aminosäuren bei Nav1.2 und Nav1.7. Nav1.8 Kanälen liegen mit etwa 265 Aminosäuren im Mittelfeld. Innerhalb der Sequenz dieser Schleife befinden sich Modifikationsstellen für intrazelluläre regulatorische Proteine, wie PKA und PKC (Malik-Hall *et al.*, 2003; Vijayaragavan *et al.*, 2004b), p38 Kinase (Hudmon *et al.*, 2008) und Nav β -Untereinheiten (Zhang *et al.*, 2008). Daher sollte eine Rolle für die Regulation der Kanalfunktion, wie beispielsweise der Verfügbarkeit, anzunehmen sein.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zum Nachweis einer PKA-Regulation von Nav1.8 sind nicht eindeutig interpretierbar. Eine akute Applikation von Forskolin konnte technisch nicht realisiert werden, da die Zellen wenn mit Lösungen ohne F⁻ gearbeitet wurde extrem instabil waren, was möglicherweise mit einer starken Präsenz von Chlorid-Kanälen und einem damit verbundenen Wasser-Einstrom erklärt werden könnte. In einem nächsten Schritt wird mit der *perforated-patch* Technik (Fan & Palade, 1998) möglicherweise eine höhere Stabilität der Zellen erreicht werden können und zudem ein geringerer Eingriff in das intrazelluläre Milieu erforderlich sein.

In der nicht-neuronalen Zelllinie HEK293 produziert keine der beiden Nav1.8 Isoformen Einwärtsströme, die signifikant über dem Endogenstrom liegen. Die Sequenz der intrazellulären Schleife zwischen Domäne-1 und Domäne-2 enthält einige putative Interaktionsstellen für in-

trazelluläre Proteine (Malik-Hall *et al.*, 2003). Insbesondere im Fall von Nav1.8 der Ratte, ist ein aus drei Argin-Resten bestehendes ER-Retentions-Signal enthalten (Zhang *et al.*, 2008). Zudem ist die Interaktion der β_3 -Untereinheit mit der Domäne-1/2 Schleife nachgewiesen wurden (Zhang *et al.*, 2008). Dieses Signal liegt innerhalb der Sequenz des Exon 11. Präsenz der optionalen Untereinheit β_3 soll dieses Signal maskieren können und eine Erhöhung der Nav1.8-Dichte in der Zellmembran bewirken (Zhang *et al.*, 2008). Nav1.8 des Menschen besitzt an Stelle eines RRR ein KRR Motiv. Ob die Interaktion von β_3 auch mit diesem Motiv erfolgt, ist nicht bekannt. Die Deletion von Exon 11 und der damit verbundene Verlust des Retentionssignales bewirkten jedenfalls keine Steigerung der Stromamplitude in neuronalen oder nicht-neuronalen Zellen. Die Bildung des Nav1.8-Proteins erfolgt in beiden Zelllinien sehr intensiv, wie aus den Aufnahmen der EGFP-Fusionskonstrukte qualitativ ersichtlich ist.

ND7/23 exprimieren endogen β_1 und β_3 (John *et al.*, 2004) wodurch die Expression von Nav1.8 in neuronalen Zelllinien begünstigt werden könnte. Es kommen aber auch andere, noch nicht identifizierte Interaktionsproteine infrage. Ein weiterer Einflussfaktor könnte sein, dass in dieser Arbeit Zelllinien von Maus und Ratte zur Expression verwendet wurden, die Spleißvariante aber nur beim Menschen vorkommt, wodurch Resultate möglicher Interaktion nicht sichtbar sind. Auch nach Injektion der cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten produzierten beiden Varianten vergleichbare Stromamplituden und auch die Ko-Injektion von humaner β_3 Untereinheit hatte keinen Einfluss auf die Stromamplituden von Nav1.8+e11. Die von Wilson *et al.* (2011) beobachtete Linksverschiebung der Gleichgewichtsinaktivierung durch β_3 bei rNav1.8 konnte hier nicht beobachtet werden. Andere Arbeiten beschreiben diesen Effekt jedoch ebenfalls nicht oder sogar gegenteilig (Vijayaragavan *et al.*, 2004c; Zhao *et al.*, 2011).

Die Sequenz von Exon 11 umfasst 98 Aminosäuren, wobei sich 30 Positionen zwischen rNav1.8 und hNav1.8 unterscheiden. Davon betroffen sind die PKA Konsensus-Sequenzen (RXXS), von denen nur eine in Exon 11 von hNav1.8, aber drei in rNav1.8 zu finden sind, das ER-Retentionssignal (RRR vs. KRR) sowie eine der zwei Interaktionsstellen (Konsensus-Sequenz SP) der p38 Kinase (SPNP in rNav1.8 Interaktion nachgewiesen, PSNP in hNav1.8 (Hudmon *et al.*, 2008)) entfällt bei hNav1.8. Dies führt möglicherweise zu einer geringeren Regulation der humanen Kanal-Variante durch Modifikationen in diesem Bereich. Denkbar ist, dass die Spleißvariante deshalb bei Nagern nicht toleriert wird.

4.7.2 NAGNAG Tandem-Spleiß-Akzeptor

Das Vorhandensein eines alternativen Spleißakzeptors an einem NAGNAG-Motiv welches die Insertion oder Deletion eines Glutamin-Restes bewirkt war bereits von Kerr *et al.* (2004) beschrieben worden. Dabei wurden jeweils 20 Transkripte von *SCN10A* aus adulten DRG-

Neuronen von Maus und Ratte untersucht und in 14 von 20 (Maus) bzw. 3 von 20 (Ratte) Fällen, die Isoform Nav1.8–Q gefunden (Kerr *et al.*, 2004), was gut mit den von uns bestimmten Häufigkeiten übereinstimmt. Wir konnten nun zeigen, dass dieses Spleißereignis mit einer Häufigkeit von $14.1 \pm 0.1\%$ auch in humanen DRG-Neuronen auftritt (Schirmeyer *et al.*, 2010).

Der Vergleich von hNav1.8+Q und hNav1.8–Q nach heterologer Expression in Neuro-2A-Zellen zeigt keine Unterschiede in den Spannungsabhängigkeiten von Aktivierung und Inaktivierung, der Kinetik und der Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung (Schirmeyer *et al.*, 2010). Auch im vorherrschenden Natriumkanal des Herzmuskels, Nav1.5, ist an homologer Position ein Spleißereignis bekannt (hNav1.5–Q1077 am Übergang von Intron 17 zu Exon 18). Zwischen hNav1.5–Q und +Q findet man ebenfalls keine elektrophysiologischen Unterschiede – erst wenn dieses Ereignis in Kombination mit anderen Polymorphismen (H558R, G1406R) auftritt, wird es klinisch bedeutsam (Makielski *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2006). Die intrazelluläre Schleife zwischen den Domänen-2 und -3 in Nav1.8 interagiert mit zytosolischen Proteinen wie Ankyrin-G (Lemaillet *et al.*, 2003), Papin und der SAST Kinase (Malik-Hall *et al.*, 2003). Die vorhergesagte Ankyrin-G Interaktionsstelle betrifft die Reste 997 bis 1006 (Lemaillet *et al.*, 2003) in hNav1.8 und ist somit vermutlich nicht von dem Spleißereignis betroffen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion mit zytosolischen Proteinen von dem NAGNAG-Spleißen betroffen ist und dies eventuell in einem heterologen Expressionssystem nicht sichtbar ist (Schirmeyer *et al.*, 2010).

5 Zusammenfassung

Nav1.8-Kanäle sind spannungsgesteuerte Natriumkanäle, die den Hauptanteil des TTX-resistenten Stromes in DRG-Neuronen vermitteln und so an der Weiterleitung von Schmerzreizen aus der Peripherie beteiligt sind. Dabei sind die molekularen Determinanten des speziellen Schaltverhaltens dieses Kanals und die Mechanismen seiner Regulation Gegenstand aktueller Forschungen. In dieser Arbeit wurde die neuronale Zelllinie Neuro-2A als neues Expressionssystem verwendet, um Nav1.8-Kanäle nach heterologer Expression isoliert von anderen Nav-Kanälen in *Whole-cell Patch-clamp* Experimenten charakterisieren zu können.

Es wurde gezeigt, dass Nav1.8 verglichen mit Nav1.4 eine etwa 20 mV stärkere Membrandepolarisation benötigt, um zu öffnen. Dieses makroskopische Schaltverhalten von Nav1.8-Kanälen wird sehr stark durch die Inaktivierungseigenschaften des Kanals bestimmt. Chemische Modifikation des zu IFC veränderten IFM-Inaktivierungsmotivs mit thiolreaktiven Substanzen ermöglichte das nahezu vollständige Ausschalten der schnellen Inaktivierung. Nav1.8 zeichnet sich durch eine für Nav-Kanäle sehr langsame Aktivierungskinetik mit Zeitkonstanten im Bereich von einigen Millisekunden aus, so dass in Folge der Entfernung der schnellen Inaktivierung ein starker Anstieg der Stromamplitude zu beobachten ist. Die kinetische Analyse der Stromantworten zeigte, dass ein Modell nach Hodgkin und Huxley mit drei Aktivierungstoren für Nav1.8-Kanäle nicht optimal ist, da bei diesen Kanälen die Aktivierung mit einem einfach exponentiellen Zeitverlauf beschrieben wird und somit durch einen langsam aktivierenden Schalter limitiert zu sein scheint. Außerdem erfolgt die Aktivierung bei negativeren Spannungen und mit einer viel stärkeren Spannungsabhängigkeit, als dies unter von der Inaktivierung überlagerten Bedingungen ersichtlich ist.

Kanalchimären wurden basierend auf einer Domänen-Austausch-Strategie konstruiert, um die Bedeutung einzelner Spannungssensoren für das Gesamtschaltverhalten des Kanals zu untersuchen. Alle Nav1.4/Nav1.8-Chimären bildeten funktionale Kanäle in Neuro-2A Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Domäne-2 alle Aktivierungseigenschaften von Nav1.8 maßgeblich bestimmt. Das Einfügen der Domäne-2 aus Nav1.8 in den Kanal Nav1.4 ist ausreichend, um den Aktivierungsphänotyp (Kinetik, Spannungsabhängigkeit) von Nav1.8 zu übertragen.

Weitere Experimente unterstützten die Bedeutung des die Aktivierung limitierenden Spannungssensors in Domäne-2. Insbesondere zwei Nav1.8-spezifische Doppellysinmotive (KK726 und KK747) in der S3S4-Schleife konnten als bedeutend identifiziert werden. Ein entsprechender Einfluss dieser Reste auf die halbmaximale Aktivierungsspannung konnte für Nav1.8 und Nav1.4 gezeigt werden. Des Weiteren scheinen Interaktionen der positiven Ladungen der Lysine mit negativen Membranphospholipiden zu bestehen, welche zur Stabilisierung des deaktivierten Zustandes bei Nav1.8 beitragen und somit stärkere Membrandepolarisationen für das Öffnen des

Kanals erforderlich machen. Spannungssensortoxine (μ O-Conotoxine, β -Skorpiontoxine), welche von extrazellulärer Seite am Spannungssensor von Domäne-2 von Nav-Kanälen angreifen, werden in ihrer Wirkung durch Mutationen der Doppellysine beeinflusst. Die hier präsentierten Daten belegen eine Beteiligung von KK726 und KK747 am Aktivierungsvorgang bei Nav1.8.

Physiologisch ist die Modulation von Kanaleigenschaften durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle bedeutsam. Experimentell wurde dies durch Applikation von Chloramin-T (ChT) simuliert. Dabei zeigte sich, dass Nav1.8 wesentlich empfindlicher reagiert als Nav1.4. Neben der Verlangsamung der schnellen Inaktivierung kann bei Nav1.8 eine Reduktion des Spitzenstromes unter ChT um etwa 50%, in Abhängigkeit von der Testpulsspannung, beobachtet werden. Für diesen Block ist Domäne-1 von Nav1.8 entscheidend, wobei die Klärung des genauen Mechanismus Gegenstand weiterer Arbeiten sein wird. Die hier beschriebene Empfindlichkeit des Gesamtstromes auf Änderungen der Aktivierung und der Inaktivierung ist vermutlich Grundlage komplexer physiologischer Regulationsprozesse mit Auswirkungen auf die Aktionspotential-Eigenschaften in DRG-Neuronen z. B. im Rahmen von Entzündungsprozessen.

Es wurden neben den verschiedenen elektrophysiologischen Eigenschaften von Nav1.8 und Nav1.4-Kanälen erhebliche Unterschiede im Expressionsniveau in nicht-neuronalen Zelllinien gefunden. Einfluss auf das Expressionsverhalten von Nav1.8 nimmt dabei der C-Terminus des Kanalproteins, insbesondere Bereiche im konservierten proximalen Teil. Es wurden Chimären mit minimalem Nav1.4 Sequenzanteil im C-Terminus von Nav1.8 hergestellt, die die Untersuchung von Nav1.8 in HEK293-Zellen ohne TTX ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei neue Spleißvarianten von *hSCN10A* beschrieben werden, welche mit speziesabhängiger Häufigkeit vorkommen. Bei keiner der Varianten wurden Änderungen des Phänotyps der Kanäle nach heterologer Expression in Neuro-2A-Zellen festgestellt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten liefern eine detaillierte Analyse der Funktionsweise von Nav1.8-Kanälen in rekombinanten Systemen. Insbesondere wurde dazu beigetragen, die mechanistischen Ursachen des kanaltypischen Aktivierungsverhaltens aufzuklären und das auch damit verbundene physiologische Regulationspotential bei diesem Kanal herauszustellen. Die vorliegende Dissertation bereitet damit die Basis für weiterführende Untersuchungen von nativen Nav1.8-Kanälen in DRG-Neuronen und trägt entscheidend zum Verständnis der Funktionsweise dieser Kanäle bei.

Summary

Nav1.8 voltage-gated sodium channels mediate the TTX-resistant sodium current of dorsal root ganglia neurons and serve as relay stations in nociception by conducting painful stimuli from the periphery to the dorsal horn. The gating characteristics and mechanisms of physiological regulation of Nav1.8 are subject of current research. In this study, the neuronal cell line Neuro-2A was used as a novel expression system to characterize Nav1.8 channels and analyze their properties isolated from other Nav channels in whole-cell patch-clamp experiments.

It was shown, that activation of Nav1.8 channels requires ~20 mV stronger depolarization of the cell membrane compared to Nav1.4. This macroscopic gating behavior is substantially influenced by the inactivation properties of the channel. Inhibition of fast inactivation by chemical modification of the modified inactivation motif with thiolreactive chemicals revealed that Nav1.8 exhibits very slow activation kinetics compared to other Nav channels, in the range of milliseconds. Removal of fast inactivation results in a substantial increase in the peak-current amplitude. Kinetic analysis of current responses of Nav1.8 showed that channel activation can be described with a single exponential time course, i.e. using a model with three activation gates according to Hodgkin and Huxley is not appropriate. Activation of Nav1.8 seems to be limited by a single, slowly activating voltagesensor. Furthermore, smaller depolarization is sufficient to activate the channel and voltage-dependence is stronger than under conditions with superimposed inactivation.

Channel chimeras based on a domain-exchange strategy were constructed to elicit the role of single voltagesensors for the gating of the whole channel. All Nav1.4/Nav1.8 chimeras produced functional channels in Neuro-2A cells. It was shown that the first channel half, especially domain-2, determines the activation properties of the channel. Insertion of domain-2 of Nav1.8 into the background of Nav1.4 is sufficient to transfer the activation phenotype (kinetics, voltage dependence) of Nav1.8.

Additional approaches supported the role of the voltagesensor in domain-2, especially two Nav1.8-specific double lysine motifs in the S3S4 region (KK726 and KK747). The role of those residues for half-maximal activation was observed for Nav1.8 and Nav1.4. Further evidence points to interactions of the positively charged lysines with negative charges of the membrane phospholipids, which contribute to a stabilization of the deactivated state of this voltagesensor. Voltagesensor toxins (μ O-conotoxins and scorpion β -toxins) targeting S4 of domain-2 are influenced by the presence of the lysine residues. These data support the importance of domain-2 and KK726 and KK747 for Nav1.8 activation gating.

Physiologically, channel function might be modulated by abnormal ROS production. This was simulated by application of the methionine-specific oxidant Chloramine-T. Inactivation of Nav1.8 was substantially more sensitive to oxidative modification than Nav1.4. Furthermore, these

channels showed a prominent reduction in peak current of about 50% directly after Chloramine-T application. This block decreased with increasing depolarization and is determined by domain-1 of Nav1.8, the exact mechanism of which remains to be elucidated. The described sensitivity of the overall current to changes in activation and inactivation is likely to be part of complex physiological regulation processes resulting in changes in action potential properties of DRG neurons.

Besides their different electrophysiological properties, Nav1.8 and Nav1.4 showed prominent differences in expression levels in non-neuronal cells. The C-terminus of Nav1.8 is involved in regulation of channel expression, especially a sequence part at the border of the conserved proximal and the non-conserved distal C-terminus. This enables the construction of chimeras containing a minimal amount of Nav1.4 sequence in the C-terminus to analyze Nav1.8 in HEK293 cells.

Furthermore, two novel splice variants of human Nav1.8 channels were described. All splice variants occur with species specific abundance. None of them changed the phenotype of the channel after heterologous expression in Neuro-2A cells.

The data described in this thesis give a detailed analysis of the function of Nav1.8 channels in recombinant systems. In particular a substantial contribution to the explanation of the typical activation behavior and the resulting regulatory potential was made. The thesis will provide the basis for further investigations of native Nav1.8 channels in DRG neurons.

6 Literaturverzeichnis

- Akiba, I., Seki, T., Mori, M., Iizuka, M., Nishimura, S., Sasaki, S., Imoto, K. & Barsoumian, E.L. (2003) Stable expression and characterization of human PN1 and PN3 sodium channels. *Receptors & channels*, **9**, 291-299.
- Akopian, A.N., Sivilotti, L. & Wood, J.N. (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, **379**, 257-262.
- Aldrich, R.W., Corey, D.P. & Stevens, C.F. (1983) A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature*, **306**, 436-441.
- An, Y., Ji, J., Wu, W., Lv, A., Huang, R. & Wei, Y. (2005) A rapid and efficient method for multiple-site mutagenesis with a modified overlap extension PCR. *Applied microbiology and biotechnology*, **68**, 774-778.
- Armstrong, C.M. (2006) Na channel inactivation from open and closed states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 17991-17996.
- Armstrong, C.M., Bezanilla, F. & Rojas, E. (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *The Journal of general physiology*, **62**, 375-391.
- Bähring, R. & Covarrubias, M. (2011) Mechanisms of closed-state inactivation in voltage-gated ion channels. *The Journal of physiology*, **589**, 461-479.
- Barrington, P.L., Martin, R.L. & Zhang, K. (1997) Slowly inactivating sodium currents are reduced by exposure to oxidative stress. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **29**, 3251-3265.
- Bendahhou, S., Cummins, T.R., Tawil, R., Waxman, S.G. & Ptacek, L.J. (1999) Activation and inactivation of the voltage-gated sodium channel: role of segment S5 revealed by a novel hyperkalaemic periodic paralysis mutation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **19**, 4762-4771.
- Bennett, E., Urcan, M.S., Tinkle, S.S., Koszowski, A.G. & Levinson, S.R. (1997) Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. A possible electrostatic mechanism. *The Journal of general physiology*, **109**, 327-343.
- Bennett, E.S. (2002) Isoform-specific effects of sialic acid on voltage-dependent Na⁺ channel gating: functional sialic acids are localized to the S5-S6 loop of domain I. *The Journal of physiology*, **538**, 675-690.
- Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 20313-20316.
- Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological reviews*, **80**, 555-592.
- Black, S.D. & Mould, D.R. (1991) Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- or cotranslational modifications. *Analytical biochemistry*, **193**, 72-82.
- Blasius, A.L., Dubin, A.E., Petrus, M.J., Lim, B.K., Narezkina, A., Criado, J.R., Wills, D.N., Xia, Y., Moresco, E.M., Ehlers, C., Knowlton, K.U., Patapoutian, A. & Beutler, B. (2011) Hypermorphic mutation of the voltage-gated sodium channel encoding gene Scn10a causes a dramatic stimulus-dependent neurobehavioral phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 19413-19418.
- Borges, A., Alfonzo, M.J., Garcia, C.C., Winand, N.J., Leipold, E. & Heinemann, S.H. (2004) Isolation, molecular cloning and functional characterization of a novel beta-toxin from the Venezuelan scorpion, *Tityus zulianus*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, **43**, 671-684.
- Bosmans, F., Maertens, C., Verdonck, F. & Tytgat, J. (2004) The poison Dart frog's batrachotoxin modulates Nav1.8. *FEBS letters*, **577**, 245-248.
- Browne, L.E., Clare, J.J. & Wray, D. (2009) Functional and pharmacological properties of human and rat Nav1.8 channels. *Neuropharmacology*, **56**, 905-914.
- Campos, F.V., Chanda, B., Beirao, P.S. & Bezanilla, F. (2008) Alpha-scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels. *The Journal of general physiology*, **132**, 251-263.
- Cannon, S.C., Brown, R.H., Jr. & Corey, D.P. (1993) Theoretical reconstruction of myotonia and paralysis caused by incomplete inactivation of sodium channels. *Biophysical journal*, **65**, 270-288.
- Catterall, W.A. (1986) Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annual review of biochemistry*, **55**, 953-985.
- Catterall, W.A. (1992) Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiological reviews*, **72**, S15-48.
- Catterall, W.A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **26**, 13-25.

- Catterall, W.A., Goldin, A.L. & Waxman, S.G. (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews*, **57**, 397-409.
- Catterall, W.A., Schmidt, J.W., Messner, D.J. & Feller, D.J. (1986) Structure and biosynthesis of neuronal sodium channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **479**, 186-203.
- Cestéle, S., Scheuer, T., Mantegazza, M., Rochat, H. & Catterall, W.A. (2001) Neutralization of gating charges in domain II of the sodium channel alpha subunit enhances voltage-sensor trapping by a beta-scorpion toxin. *The Journal of general physiology*, **118**, 291-302.
- Cestéle, S. & Catterall, W.A. (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie*, **82**, 883-892.
- Chahine, M. & O'Leary, M.E. (2011) Regulatory Role of Voltage-Gated Na Channel beta Subunits in Sensory Neurons. *Frontiers in pharmacology*, **2**, 70.
- Chakrapani, S., Sompornpisut, P., Intharathep, P., Roux, B. & Perozo, E. (2010) The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 5435-5440.
- Chambers, J.C., Zhao, J., Terracciano, C.M., Bezzina, C.R., Zhang, W., Kaba, R., Navaratnarajah, M., Lotlikar, A., Sehmi, J.S., Kooner, M.K., Deng, G., Siedlecka, U., Parasramka, S., El-Hamamsy, I., Wass, M.N., Dekker, L.R., de Jong, J.S., Sternberg, M.J., McKenna, W., Severs, N.J., de Silva, R., Wilde, A.A., Anand, P., Yacoub, M., Scott, J., Elliott, P., Wood, J.N. & Kooner, J.S. (2010) Genetic variation in SCN10A influences cardiac conduction. *Nature genetics*, **42**, 149-152.
- Chanda, B. & Bezanilla, F. (2002) Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation. *The Journal of general physiology*, **120**, 629-645.
- Chatelier, A., Dahllund, L., Eriksson, A., Krupp, J. & Chahine, M. (2008) Biophysical properties of human Na v1.7 splice variants and their regulation by protein kinase A. *Journal of neurophysiology*, **99**, 2241-2250.
- Chen, H., Gordon, D. & Heinemann, S.H. (2000) Modulation of cloned skeletal muscle sodium channels by the scorpion toxins Lqh II, Lqh III, and Lqh alphaIT. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **439**, 423-432.
- Chen, L.Q., Santarelli, V., Horn, R. & Kallen, R.G. (1996) A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels. *The Journal of general physiology*, **108**, 549-556.
- Choi, J.S., Hudmon, A., Waxman, S.G. & Dib-Hajj, S.D. (2006) Calmodulin regulates current density and frequency-dependent inhibition of sodium channel Nav1.8 in DRG neurons. *Journal of neurophysiology*, **96**, 97-108.
- Choi, J.S., Tyrrell, L., Waxman, S.G. & Dib-Hajj, S.D. (2004) Functional role of the C-terminus of voltage-gated sodium channel Na(v)1.8. *FEBS letters*, **572**, 256-260.
- Clarkson, C.W. (1990) Modification of Na channel inactivation by alpha-chymotrypsin in single cardiac myocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **417**, 48-57.
- Cormier, J.W., Rivolta, I., Tateyama, M., Yang, A.S. & Kass, R.S. (2002) Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 9233-9241.
- Cummins, T.R., Sheets, P.L. & Waxman, S.G. (2007) The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain*, **131**, 243-257.
- Dekker, L.V., Daniels, Z., Hick, C., Elsegood, K., Bowden, S., Szeszak, T., Burley, J.R., Southan, A., Cronk, D. & James, I.F. (2005) Analysis of human Nav1.8 expressed in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *European journal of pharmacology*, **528**, 52-58.
- Deschênes, I. (2002) Isoform-Specific Modulation of Voltage-Gated Na⁺ Channels by Calmodulin. *Circulation Research*, **90**, 49e-57.
- Deschênes, I., Trottier, E. & Chahine, M. (2001) Implication of the C-Terminal Region of the alpha-Subunit of Voltage-gated Sodium Channels in Fast Inactivation. *Journal of Membrane Biology*, **183**, 103-114.
- Deschênes, I., Trottier, E. & Chahine, M. (1999) Cysteine scanning analysis of the IFM cluster in the inactivation gate of a human heart sodium channel. *Cardiovascular research*, **42**, 521-529.
- Dib-Hajj, S.D., Ishikawa, K., Cummins, T.R. & Waxman, S.G. (1997) Insertion of a SNS-specific tetrapeptide in S3-S4 linker of D4 accelerates recovery from inactivation of skeletal muscle voltage-gated Na channel mu1 in HEK293 cells. *FEBS letters*, **416**, 11-14.
- Djouhri, L., Fang, X., Okuse, K., Wood, J.N., Berry, C.M. & Lawson, S.N. (2003) The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *The Journal of physiology*, **550**, 739-752.
- Donier, E., Rugiero, F., Okuse, K. & Wood, J.N. (2005) Annexin II light chain p11 promotes functional expression of acid-sensing ion channel ASIC1a. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 38666-38672.

- Ekberg, J., Jayamanne, A., Vaughan, C.W., Aslan, S., Thomas, L., Mould, J., Drinkwater, R., Baker, M.D., Abrahamsen, B., Wood, J.N., Adams, D.J., Christie, M.J. & Lewis, R.J. (2006) μ O-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 17030-17035.
- Elliott, A.A. & Elliott, J.R. (1993) Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *The Journal of physiology*, **463**, 39-56.
- Faber, C.G., Lauria, G., Merkies, I.S., Cheng, X., Han, C., Ahn, H.S., Persson, A.K., Hoeijmakers, J.G., Gerrits, M.M., Pierro, T., Lombardi, R., Kapetis, D., Dib-Hajj, S.D. & Waxman, S.G. (2012) Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 19444-19449.
- Facer, P., Punjabi, P.P., Abrari, A., Kaba, R.A., Severs, N.J., Chambers, J., Kooner, J.S. & Anand, P. (2011) Localisation of SCN10A gene product Na(v)1.8 and novel pain-related ion channels in human heart. *International heart journal*, **52**, 146-152.
- Fan, J.S. & Palade, P. (1998) Perforated patch recording with beta-escin. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **436**, 1021-1023.
- Farmer, C., Cox, J.J., Fletcher, E.V., Woods, C.G., Wood, J.N. & Schorge, S. (2012) Splice variants of Na(V)1.7 sodium channels have distinct beta subunit-dependent biophysical properties. *PloS one*, **7**, e41750.
- Fitzgerald, E.M., Okuse, K., Wood, J.N., Dolphin, A.C. & Moss, S.J. (1999) cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *The Journal of physiology*, **516 (Pt 2)**, 433-446.
- Foulkes, T., Nassar, M.A., Lane, T., Matthews, E.A., Baker, M.D., Gerke, V., Okuse, K., Dickenson, A.H. & Wood, J.N. (2006) Deletion of annexin 2 light chain p11 in nociceptors causes deficits in somatosensory coding and pain behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 10499-10507.
- Fukuda, K., Davies, S.S., Nakajima, T., Ong, B.H., Kupersmidt, S., Fessel, J., Amarnath, V., Anderson, M.E., Boyden, P.A., Viswanathan, P.C., Roberts, L.J., 2nd & Balser, J.R. (2005) Oxidative mediated lipid peroxidation recapitulates proarrhythmic effects on cardiac sodium channels. *Circ Res*, **97**, 1262-1269.
- Goldin, A.L. (2002) Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *The Journal of experimental biology*, **205**, 575-584.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., Noda, M., Tamkun, M.M., Waxman, S.G., Wood, J.N. & Catterall, W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **28**, 365-368.
- Gonoi, T. & Hille, B. (1987) Gating of Na channels. Inactivation modifiers discriminate among models. *The Journal of general physiology*, **89**, 253-274.
- Grant, A.O., Chandra, R., Keller, C., Carboni, M. & Starmer, C.F. (2000) Block of wild-type and inactivation-deficient cardiac sodium channels IFM/QQQ stably expressed in mammalian cells. *Biophysical journal*, **79**, 3019-3035.
- Groome, J., Lehmann-Horn, F. & Holzherr, B. (2011) Open- and closed-state fast inactivation in sodium channels: differential effects of a site-3 anemone toxin. *Channels (Austin)*, **5**, 65-78.
- Guy, H.R. & Seetharamulu, P. (1986) Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 508-512.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **391**, 85-100.
- Han, J.Y. & Kim, J.B. (2011) Familial hyperkalemic periodic paralysis caused by a de novo mutation in the sodium channel gene SCN4A. *Korean journal of pediatrics*, **54**, 470-472.
- Hanck, D.A. & Sheets, M.F. (1995) Modification of inactivation in cardiac sodium channels: ionic current studies with Anthopleurin-A toxin. *The Journal of general physiology*, **106**, 601-616.
- Hansel, A., Heinemann, S.H. & Hoshi, T. (2005) Heterogeneity and function of mammalian MSRs: enzymes for repair, protection and regulation. *Biochimica et biophysica acta*, **1703**, 239-247.
- Hansson, M.D., Rzeznicka, K., Rosenback, M., Hansson, M. & Sirijovski, N. (2008) PCR-mediated deletion of plasmid DNA. *Analytical biochemistry*, **375**, 373-375.
- He, B. & Soderlund, D.M. (2010) Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na v 1.7 sodium channels. *Neuroscience letters*, **469**, 268-272.
- Heinemann, S.H. & Leipold, E. (2007) Conotoxins of the O-superfamily affecting voltage-gated sodium channels. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **64**, 1329-1340.

- Heinemann, S.H., Terlau, H., Stuhmer, W., Imoto, K. & Numa, S. (1992) Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, **356**, 441-443.
- Hille, B. (1978) Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophysical journal*, **22**, 283-294.
- Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc 2001-07.
- Hirschberg, B., Rovner, A., Lieberman, M. & Patlak, J. (1995) Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels. *The Journal of general physiology*, **106**, 1053-1068.
- Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M.M., Yoshida, S. & Noda, M. (2002) Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature neuroscience*, **5**, 511-512.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. & Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51-59.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, **117**, 500-544.
- Hool, L.C. (2006) Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, **33**, 146-151.
- Hoshi, T. & Heinemann, S. (2001) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of physiology*, **531**, 1-11.
- Hsieh, C.P. (2008) Redox modulation of A-type K⁺ currents in pain-sensing dorsal root ganglion neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, **370**, 445-449.
- Hudmon, A., Choi, J.S., Tyrrell, L., Black, J.A., Rush, A.M., Waxman, S.G. & Dib-Hajj, S.D. (2008) Phosphorylation of sodium channel Na(v)1.8 by p38 mitogen-activated protein kinase increases current density in dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 3190-3201.
- Hsieh, C.P. (2008) Redox modulation of A-type K⁺ currents in pain-sensing dorsal root ganglion neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, **370**, 445-449.
- Imai, Y., Matsushima, Y., Sugimura, T. & Terada, M. (1991) A simple and rapid method for generating a deletion by PCR. *Nucleic acids research*, **19**, 2785.
- Jarvis, M.F., Honore, P., Shieh, C.C., Chapman, M., Joshi, S., Zhang, X.F., Kort, M., Carroll, W., Marron, B., Atkinson, R., Thomas, J., Liu, D., Krambis, M., Liu, Y., McGaraughty, S., Chu, K., Roeloffs, R., Zhong, C., Mikusa, J.P., Hernandez, G., Gauvin, D., Wade, C., Zhu, C., Pai, M., Scanio, M., Shi, L., Drizin, I., Gregg, R., Matulenko, M., Hakeem, A., Gross, M., Johnson, M., Marsh, K., Wagoner, P.K., Sullivan, J.P., Faltynek, C.R. & Krafte, D.S. (2007) A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 8520-8525.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A. & MacKinnon, R. (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature*, **423**, 42-48.
- John, V.H., Main, M.J., Powell, A.J., Gladwell, Z.M., Hick, C., Sidhu, H.S., Clare, J.J., Tate, S. & Trezise, D.J. (2004) Heterologous expression and functional analysis of rat Nav1.8 (SNS) voltage-gated sodium channels in the dorsal root ganglion neuroblastoma cell line ND7-23. *Neuropharmacology*, **46**, 425-438.
- Johnson, D., Montpetit, M.L., Stocker, P.J. & Bennett, E.S. (2004) The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 44303-44310.
- Joshi, S.K., Mikusa, J.P., Hernandez, G., Baker, S., Shieh, C.C., Neelands, T., Zhang, X.F., Niforatos, W., Kage, K., Han, P., Krafte, D., Faltynek, C., Sullivan, J.P., Jarvis, M.F. & Honore, P. (2006) Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. *Pain*, **123**, 75-82.
- Jurman, M.E., Boland, L.M., Liu, Y. & Yellen, G. (1994) Visual identification of individual transfected cells for electrophysiology using antibody-coated beads. *BioTechniques*, **17**, 876-881.
- Kassmann, M., Hansel, A., Leipold, E., Birkenbeil, J., Lu, S.Q., Hoshi, T. & Heinemann, S.H. (2008) Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, **456**, 1085-1095.
- Kellenberger, S., West, J.W., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1997) Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. *The Journal of general physiology*, **109**, 589-605.
- Kerr, B.J., Souslova, V., McMahon, S.B. & Wood, J.N. (2001) A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain. *Neuroreport*, **12**, 3077-3080.

- Kerr, N.C., Holmes, F.E. & Wymnick, D. (2004) Novel isoforms of the sodium channels Nav1.8 and Nav1.5 are produced by a conserved mechanism in mouse and rat. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 24826-24833.
- Keynes, R.D. (1994) Bimodal gating of the Na⁺ channel. *Trends in neurosciences*, **17**, 58-61.
- Kim, J., Hahn, Y., Sohn, E.H., Lee, Y.J., Yun, J.H., Kim, J.M. & Chung, J.H. (2001) Phenotypic variation of a Thr704Met mutation in skeletal sodium channel gene in a family with paralysis periodica paramyotonia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **70**, 618-623.
- Knapp, O., McArthur, J.R. & Adams, D.J. (2012) Conotoxins targeting neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: potential analgesics? *Toxins*, **4**, 1236-1260.
- Knapp, O., Nevin, S., Yasuda, T., Lawrence, N., Lewis, R. & Adams, D. (2012) Biophysical properties of Na(v) 1.8/Na(v) 1.2 chimeras and inhibition by microO-conotoxin MrVIB. *British journal of pharmacology*, **166**, 2148-2160.
- Kolbe, K., Schonherr, R., Gessner, G., Sahoo, N., Hoshi, T. & Heinemann, S.H. (2010) Cysteine 723 in the C-linker segment confers oxidative inhibition of hERG1 potassium channels. *The Journal of physiology*, **588**, 2999-3009.
- Kuhn, F.J. & Greeff, N.G. (1999) Movement of voltage sensor S4 in domain 4 is tightly coupled to sodium channel fast inactivation and gating charge immobilization. *The Journal of general physiology*, **114**, 167-183.
- Kuzmenkin, A., Bezanilla, F. & Correa, A.M. (2004) Gating of the bacterial sodium channel, NaChBac: voltage-dependent charge movement and gating currents. *The Journal of general physiology*, **124**, 349-356.
- Lee, A. & Goldin, A.L. (2009) Role of the terminal domains in sodium channel localization. *Channels (Austin)*, **3**, 171-180.
- Lee, S.Y., Lee, A., Chen, J. & MacKinnon, R. (2005) Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 15441-15446.
- Leffler, A., Herzog, R.I., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G. & Cummins, T.R. (2005) Pharmacological properties of neuronal TTX-resistant sodium channels and the role of a critical serine pore residue. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, **451**, 454-463.
- Leipold, E., Borges, A. & Heinemann, S.H. (2012) Scorpion beta-toxin interference with NaV channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes. *The Journal of general physiology*, **139**, 305-319.
- Leipold, E., Markgraf, R., Miloslavina, A., Kijas, M., Schirmeyer, J., Imhof, D. & Heinemann, S.H. (2011) Molecular determinants for the subtype specificity of mu-conotoxin SIIIA targeting neuronal voltage-gated sodium channels. *Neuropharmacology*, **61**, 105-111.
- Leipold, E., DeBie, H., Zorn, S., Borges, A., Olivera, B.M., Terlau, H. & Heinemann, S.H. (2007) muO conotoxins inhibit NaV channels by interfering with their voltage sensors in domain-2. *Channels (Austin)*, **1**, 253-262.
- Leipold, E., Hansel, A., Borges, A. & Heinemann, S.H. (2006) Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3. *Molecular pharmacology*, **70**, 340-347.
- Leipold, E., Hansel, A., Olivera, B.M., Terlau, H. & Heinemann, S.H. (2005) Molecular interaction of delta-conotoxins with voltage-gated sodium channels. *FEBS letters*, **579**, 3881-3884.
- Leipold, E., Lu, S., Gordon, D., Hansel, A. & Heinemann, S.H. (2004) Combinatorial interaction of scorpion toxins Lqh-2, Lqh-3, and LqhalphalT with sodium channel receptor sites-3. *Molecular pharmacology*, **65**, 685-691.
- Leipold, E., Lu, S., Gordon, D., Hansel, A. & Heinemann, S.H. (2004) Combinatorial interaction of scorpion toxins Lqh-2, Lqh-3, and LqhalphalT with sodium channel receptor sites-3. *Molecular pharmacology*, **65**, 685-691.
- Leipold, E., Markgraf, R., Miloslavina, A., Kijas, M., Schirmeyer, J., Imhof, D. & Heinemann, S.H. (2011) Molecular determinants for the subtype specificity of mu-conotoxin SIIIA targeting neuronal voltage-gated sodium channels. *Neuropharmacology*, **61**, 105-111.
- Lemaitre, G., Walker, B. & Lambert, S. (2003) Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 27333-27339.
- Levine, R.L., Berlett, B.S., Moskowitz, J., Mosoni, L. & Stadtman, E.R. (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of ageing and development*, **107**, 323-332.
- Li, Q., Su, Y.Y., Wang, H., Li, L., Wang, Q. & Bao, L. (2010) Transmembrane segments prevent surface expression of sodium channel Nav1.8 and promote calnexin-dependent channel degradation. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 32977-32987.

- Lipkind, G.M. & Fozzard, H.A. (2000) KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na(+) channel pore. *Biochemistry*, **39**, 8161-8170.
- Lipkind, G.M. & Fozzard, H.A. (2008) Voltage-gated Na channel selectivity: the role of the conserved domain III lysine residue. *The Journal of general physiology*, **131**, 523-529.
- Lipkind, G.M., Hanck, D.A. & Fozzard, H.A. (1995) A structural motif for the voltage-gated potassium channel pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 9215-9219.
- Liu, C., Li, Q., Su, Y. & Bao, L. (2010) Prostaglandin E2 promotes Na1.8 trafficking via its intracellular RRR motif through the protein kinase A pathway. *Traffic*, **11**, 405-417.
- Logothetis, D.E., Movahedi, S., Satler, C., Lindpaintner, K. & Nadal-Ginard, B. (1992) Incremental reductions of positive charge within the S4 region of a voltage-gated K⁺ channel result in corresponding decreases in gating charge. *Neuron*, **8**, 531-540.
- Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B. & MacKinnon, R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, **450**, 376-382.
- Lu, Z., Klem, A.M. & Ramu, Y. (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *The Journal of general physiology*, **120**, 663-676.
- Luo, A., Ma, J., Zhang, P., Zhou, H. & Wang, W. (2007) Sodium channel gating modes during redox reaction. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, **19**, 9-20.
- Luo, S. & Levine, R.L. (2009) Methionine in proteins defends against oxidative stress. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **23**, 464-472.
- Ma, F., Zhang, L. & Westlund, K.N. (2009) Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons. *Molecular pain*, **5**, 31.
- Makielski, J.C., Ye, B., Valdivia, C.R., Pagel, M.D., Pu, J., Tester, D.J. & Ackerman, M.J. (2003) A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circ Res*, **93**, 821-828.
- Malik-Hall, M., Poon, W.Y., Baker, M.D., Wood, J.N. & Okuse, K. (2003) Sensory neuron proteins interact with the intracellular domains of sodium channel Nav1.8. *Brain research. Molecular brain research*, **110**, 298-304.
- Mantegazza, M. & Cestele, S. (2005) Beta-scorpion toxin effects suggest electrostatic interactions in domain II of voltage-dependent sodium channels. *The Journal of physiology*, **568**, 13-30.
- Mantegazza, M., Yu, F.H., Catterall, W.A. & Scheuer, T. (2001) Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 15348-15353.
- Markgraf, R., Leipold, E., Schirmeyer, J., Paolini-Bertrand, M., Hartley, O. & Heinemann, S.H. (2012) Mechanism and molecular basis for the sodium channel subtype specificity of micro-conopeptide CnIIIC. *British journal of pharmacology*, **167**, 576-586.
- Matthews, E.A., Wood, J.N. & Dickenson, A.H. (2006) Na(v) 1.8-null mice show stimulus-dependent deficits in spinal neuronal activity. *Molecular pain*, **2**, 5.
- McPhee, J.C., Ragsdale, D.S., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1995) A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 12025-12034.
- McPhee, J.C., Ragsdale, D.S., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1998) A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 1121-1129.
- Morgan, K., Stevens, E.B., Shah, B., Cox, P.J., Dixon, A.K., Lee, K., Pinnock, R.D., Hughes, J., Richardson, P.J., Mizuguchi, K. & Jackson, A.P. (2000) beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 2308-2313.
- Okuse, K., Malik-Hall, M., Baker, M.D., Poon, W.Y., Kong, H., Chao, M.V. & Wood, J.N. (2002) Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature*, **417**, 653-656.
- Patino, G.A. & Isom, L.L. (2010) Electrophysiology and beyond: multiple roles of Na⁺ channel beta subunits in development and disease. *Neuroscience letters*, **486**, 53-59.
- Patrick Harty, T. & Waxman, S.G. (2007) Inactivation properties of sodium channel Nav1.8 maintain action potential amplitude in small DRG neurons in the context of depolarization. *Molecular pain*, **3**, 12.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N. & Catterall, W.A. (2011) The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, **475**, 353-358.
- Plummer, N.W. & Meisler, M.H. (1999) Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics*, **57**, 323-331.

- Poon, W.Y.L., Malik-Hall, M., Wood, J.N. & Okuse, K. (2004) Identification of binding domains in the sodium channel NaV1.8 intracellular N-terminal region and annexin II light chain p11. *FEBS letters*, **558**, 114-118.
- Ptacek, L.J., George, A.L., Jr., Griggs, R.C., Tawil, R., Kallen, R.G., Barchi, R.L., Robertson, M. & Leppert, M.F. (1991) Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis. *Cell*, **67**, 1021-1027.
- Renganathan, M., Cummins, T.R., Hormuzdiar, W.N. & Waxman, S.G. (2000) α -SNS produces the slow TTX-resistant sodium current in large cutaneous afferent DRG neurons. *Journal of neurophysiology*, **84**, 710-718.
- Renganathan, M., Cummins, T.R. & Waxman, S.G. (2001) Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *Journal of neurophysiology*, **86**, 629-640.
- Rogers, J.C., Qu, Y., Tanada, T.N., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1996) Molecular determinants of high affinity binding of α -scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel α subunit. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 15950-15962.
- Rohl, C.A., Boeckman, F.A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W.A. & Klevit, R.E. (1999) Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry*, **38**, 855-861.
- Rozanski, G.J. & Xu, Z. (2002) Sulfhydryl modulation of K⁺ channels in rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **34**, 1623-1632.
- Saab, C.Y., Cummins, T.R., Dib-Hajj, S.D. & Waxman, S.G. (2002) Molecular determinant of Na(v)1.8 sodium channel resistance to the venom from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *Neuroscience letters*, **331**, 79-82.
- Schirmeyer, J., Szafranski, K., Leipold, E., Mawrin, C., Platzter, M. & Heinemann, S.H. (2010) A subtle alternative splicing event of the Na(V)1.8 voltage-gated sodium channel is conserved in human, rat, and mouse. *Journal of molecular neuroscience : MN*, **41**, 310-314.
- Schirmeyer, J. (2007) Funktionelle Analyse des spannungsgesteuerten Natriumkanals Na_v1.8 nach heterologer Expression in HEK293- und Neuro-2A-Zellen. Diplomarbeit. *Lehrstuhl für Biophysik. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena*.
- Schlieff, T., Schönherr, R., Imoto, K. & Heinemann, S.H. (1996) Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *European biophysics journal : EBJ*, **25**, 75-91.
- Schroeter, A., Walzik, S., Blechschmidt, S., Haufe, V., Benndorf, K. & Zimmer, T. (2010) Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Na(v)1.5. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **49**, 16-24.
- Schroll, A.L., Hondal, R.J. & Flemer, S., Jr. (2012) 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP) as an effective and gentle deprotectant for common cysteine protecting groups. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*, **18**, 1-9.
- Seoh, S.A., Sigg, D., Papazian, D.M. & Bezanilla, F. (1996) Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron*, **16**, 1159-1167.
- Shah, B.S., Stevens, E.B., Gonzalez, M.I., Bramwell, S., Pinnock, R.D., Lee, K. & Dixon, A.K. (2000) β 3, a novel auxiliary subunit for the voltage-gated sodium channel, is expressed preferentially in sensory neurons and is upregulated in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *The European journal of neuroscience*, **12**, 3985-3990.
- Shechter, Y., Burstein, Y. & Patchornik, A. (1975) Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry*, **14**, 4497-4503.
- Souslova, V.A., Fox, M., Wood, J.N. & Akopian, A.N. (1997) Cloning and characterization of a mouse sensory neuron tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel gene, *Scn10a*. *Genomics*, **41**, 201-209.
- Shechter, Y., Burstein, Y. & Patchornik, A. (1975) Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry*, **14**, 4497-4503.
- Sheets, M.F. & Hanck, D.A. (1995) Voltage-dependent open-state inactivation of cardiac sodium channels: gating current studies with Anthopleurin-A toxin. *The Journal of general physiology*, **106**, 617-640.
- Sheets, M.F. & Hanck, D.A. (2002) The outermost lysine in the S4 of domain III contributes little to the gating charge in sodium channels. *Biophysical journal*, **82**, 3048-3055.
- Sheets, M.F. & Hanck, D.A. (2005) Charge immobilization of the voltage sensor in domain IV is independent of sodium current inactivation. *The Journal of physiology*, **563**, 83-93.
- Sivilotti, L., Okuse, K., Akopian, A.N., Moss, S. & Wood, J.N. (1997) A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. *FEBS letters*, **409**, 49-52.
- Smith, M.R. & Goldin, A.L. (1997) Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophysical journal*, **73**, 1885-1895.

- Smith, R.D. & Goldin, A.L. (1996) Phosphorylation of brain sodium channels in the I-II linker modulates channel function in *Xenopus* oocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 1965-1974.
- Sokolov, S., Kraus, R.L., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (2008) Inhibition of sodium channel gating by trapping the domain II voltage sensor with protoxin II. *Molecular pharmacology*, **73**, 1020-1028.
- Sokolov, S., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (2005) Ion permeation through a voltage-sensitive gating pore in brain sodium channels having voltage sensor mutations. *Neuron*, **47**, 183-189.
- Souslova, V.A., Fox, M., Wood, J.N. & Akopian, A.N. (1997) Cloning and characterization of a mouse sensory neuron tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel gene, *Scn10a*. *Genomics*, **41**, 201-209.
- Strichartz, G. (1976) Molecular mechanisms of nerve block by local anesthetics. *Anesthesiology*, **45**, 421-441.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H. & Numa, S. (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, **339**, 597-603.
- Su, Z., Limberis, J., Martin, R.L., Xu, R., Kolbe, K., Heinemann, S.H., Hoshi, T., Cox, B.F. & Gintant, G.A. (2007) Functional consequences of methionine oxidation of hERG potassium channels. *Biochemical pharmacology*, **74**, 702-711.
- Swartz, K.J. (2008) Sensing voltage across lipid membranes. *Nature*, **456**, 891-897.
- Tan, B.H., Valdivia, C.R., Song, C. & Makielski, J.C. (2006) Partial expression defect for the SCN5A missense mutation G1406R depends on splice variant background Q1077 and rescue by mexiletine. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **291**, H1822-1828.
- Tao, X., Lee, A., Limapichat, W., Dougherty, D.A. & MacKinnon, R. (2010) A gating charge transfer center in voltage sensors. *Science*, **328**, 67-73.
- Tao, X. & MacKinnon, R. (2008) Functional analysis of Kv1.2 and paddle chimera Kv channels in planar lipid bilayers. *Journal of molecular biology*, **382**, 24-33.
- Tang, L., Kallen, R.G. & Horn, R. (1996) Role of an S4-S5 linker in sodium channel inactivation probed by mutagenesis and a peptide blocker. *The Journal of general physiology*, **108**, 89-104.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stühmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K. & Numa, S. (1991) Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS letters*, **293**, 93-96.
- Trimmer, J.S., Cooperman, S.S., Tomiko, S.A., Zhou, J.Y., Crean, S.M., Boyle, M.B., Kallen, R.G., Sheng, Z.H., Barchi, R.L., Sigworth, F.J. & et al. (1989) Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron*, **3**, 33-49.
- Ulbricht, W. (2005) Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiological reviews*, **85**, 1271-1301.
- Valenzuela, C. & Bennett, P.B., Jr. (1994) Gating of cardiac Na⁺ channels in excised membrane patches after modification by alpha-chymotrypsin. *Biophysical journal*, **67**, 161-171.
- Vandenberg, C.A. & Bezanilla, F. (1991) A sodium channel gating model based on single channel, macroscopic ionic, and gating currents in the squid giant axon. *Biophysical journal*, **60**, 1511-1533.
- Vassilev, P.M., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*, **241**, 1658-1661.
- Verkerk, A.O., Remme, C.A., Schumacher, C.A., Scicluna, B.P., Wolswinkel, R., de Jonge, B., Bezzina, C.R. & Veldkamp, M.W. (2012) Functional Nav1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circ Res*, **111**, 333-343.
- Vijayaragavan, K., Acharfi, S. & Chahine, M. (2004a) The C-terminal region as a modulator of rNa(v)1.7 and rNa(v)1.8 expression levels. *FEBS letters*, **559**, 39-44.
- Vijayaragavan, K., Boutjdir, M. & Chahine, M. (2004b) Modulation of Nav1.7 and Nav1.8 peripheral nerve sodium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Journal of neurophysiology*, **91**, 1556-1569.
- Vijayaragavan, K., Powell, A.J., Kinghorn, I.J. & Chahine, M. (2004c) Role of auxiliary beta1-, beta2-, and beta3-subunits and their interaction with Na(v)1.8 voltage-gated sodium channel. *Biochemical and biophysical research communications*, **319**, 531-540.
- Wang, G.K. (1984) Modification of sodium channel inactivation in single myelinated nerve fibers by methionine-reactive chemicals. *Biophysical journal*, **46**, 121-124.
- Wang, G.K. (1984a) Irreversible modification of sodium channel inactivation in toad myelinated nerve fibres by the oxidant chloramine-T. *The Journal of physiology*, **346**, 127-141.
- Wang, H.J., Li, Y.L., Zhang, L.B., Zucker, I.H., Gao, L., Zimmerman, M.C. & Wang, W. (2011) Endogenous reactive oxygen species modulates voltage-gated sodium channels in dorsal root ganglia of rats. *J Appl Physiol*, **110**, 1439-1447.
- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., St John, G., Nathan, C. & Brot, N. (2002) Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Archives of biochemistry and biophysics*, **397**, 172-178.

- West, J.W., Patton, D.E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A.L. & Catterall, W.A. (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 10910-10914.
- Wilson, M.J., Zhang, M.M., Azam, L., Olivera, B.M., Bulaj, G. & Yoshikami, D. (2011) Navbeta subunits modulate the inhibition of Nav1.8 by the analgesic gating modifier muO-conotoxin MrVIB. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **338**, 687-693.
- Wolin, M.S., Ahmad, M. & Gupte, S.A. (2005) Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing mechanisms: basic concepts, current controversies, and potential importance of cytosolic NADPH. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **289**, L159-173.
- Wood, J.N., Bevan, S.J., Coote, P.R., Dunn, P.M., Harmar, A., Hogan, P., Latchman, D.S., Morrison, C., Rougon, G., Theveniau, M. & et al. (1990) Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **241**, 187-194.
- Yamaoka, K., Inoue, M., Miyazaki, K., Hiramata, M., Kondo, C., Kinoshita, E., Miyoshi, H. & Seyama, I. (2009) Synthetic ciguatoxins selectively activate Nav1.8-derived chimeric sodium channels expressed in HEK293 cells. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 7597-7605.
- Yang, T., Attack, T.C., Stroud, D.M., Zhang, W., Hall, L. & Roden, D.M. (2012) Blocking Scn10a channels in heart reduces late sodium current and is antiarrhythmic. *Circ Res*, **111**, 322-332.
- Yeiser, A.J., Cox, J.R. & Wright, S.N. (2004) Voltage-dependent inhibition of rat skeletal muscle sodium channels by aminoglycoside antibiotics. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, **448**, 204-213.
- Zhang, H., Kolibal, S., Vanderkooi, J.M., Cohen, S.A. & Kallen, R.G. (2000) A carboxy-terminal alpha-helical segment in the rat skeletal muscle voltage-dependent Na⁺ channel is responsible for its interaction with the amino-terminus. *Biochimica et biophysica acta*, **1467**, 406-418.
- Zhang, Y., Han, H., Wang, J., Wang, H., Yang, B. & Wang, Z. (2003) Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K⁺ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 10417-10426.
- Zhang, Z.N., Li, Q., Liu, C., Wang, H.B., Wang, Q. & Bao, L. (2008) The voltage-gated Na⁺ channel Nav1.8 contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the beta3 subunit. *Journal of cell science*, **121**, 3243-3252.
- Zhao, J., O'Leary, M.E. & Chahine, M. (2011) Regulation of Na(v)1.6 and Na(v)1.8 peripheral nerve Na⁺ channels by auxiliary beta-subunits. *Journal of neurophysiology*, **106**, 608-619.
- Zhao, J., Ziane, R., Chatelier, A., O'Leary, M. E. & Chahine, M. (2007) Lidocaine promotes the trafficking and functional expression of Na(v)1.8 sodium channels in mammalian cells. *Journal of neurophysiology*, **98**, 467-477.
- Zhou, J. (2002) Phosphorylation and Putative ER Retention Signals Are Required for Protein Kinase A-Mediated Potentiation of Cardiac Sodium Current. *Circulation Research*, **91**, 540-546.
- Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C.M., Carr, R.W., Kobayashi, J., Nau, C., Wood, J.N. & Reeh, P.W. (2007) Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature*, **447**, 855-858.
- Zorn, S., Leipold, E., Hansel, A., Bulaj, G., Olivera, B.M., Terlau, H. & Heinemann, S.H. (2006) The muO-conotoxin MrVIA inhibits voltage-gated sodium channels by associating with domain-3. *FEBS letters*, **580**, 1360-1364.

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan H. Heinemann. Er gab mir die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses interessanten Themas unter hervorragenden Bedingungen und hat mich während der Arbeit am Thema durch stete Verbesserungsvorschläge unterstützt und es immer wieder geschafft, mich mit Ideen und Impulsen neu zu motivieren.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Christian Mawrin für die Bereitstellung der Gewebeproben und bei Dr. Karol Szafranski und Dr. Matthias Platzer für die Detektion und Quantifizierung der Spleißvarianten.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Biophysik und Biochemie am CMB danke ich für die stets freundschaftliche und produktive Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere danke ich Dr. Enrico Leipold für die fruchtbaren Diskussionen. Ich möchte mich vor allem bei Nadine und René, Rayk und Kristin für den regen Gedankenaustausch, sowie die moralische Unterstützung in wiederkehrenden Dissertationskrisen bedanken. Besonderer Dank gebührt auch Angela, Steffi und Anja im Kampf gegen das Chaos und für das Ermöglichen eines reibungslosen Laborbetriebs.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Partner und meiner Familie – meinen Eltern und meinen Brüdern – für den Zusammenhalt und die Kraft, die ich immer wieder neu aus allem, was wir gemeinsam geschaffen und geschafft haben, gewinnen konnte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.
- ich diese Dissertation selbst angefertigt habe. Alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit an entsprechender Stelle angegeben.
- dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
- ich diese Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.
- ich bei keiner anderen Hochschule eine Dissertation eingereicht habe.

Jena, März 2013

Jana Schirmeyer

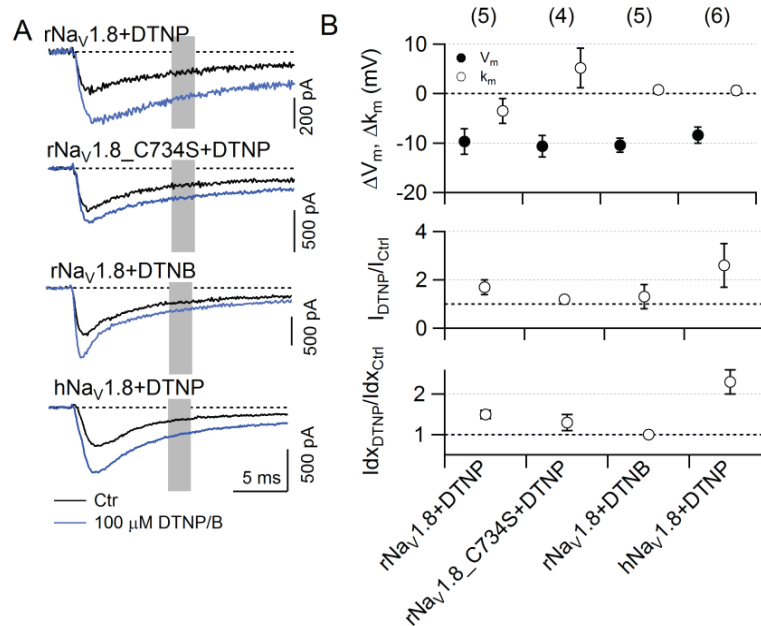
S1 **Nav1.8-IFM Kanäle und DTNP/ DTNB**

Abb. S-1 Effekt von 100 μ M DTNP bzw. DTNB auf Nav1.8-IFM Kanäle. **A** Stromantworten auf Depolarisation auf 0 mV vor (schwarz) und im Gleichgewicht nach Applikation (blau). Der graue Balken markiert den Zeitbereich von 10 ± 1 ms, in dem der Inaktivierungsindex bestimmt wurde. **B** Absolute Verschiebungen von V_m und k_m (oben), Anstieg des Spitzenstromes bei 0 mV (Mitte) und Änderung des Inaktivierungsindex bei 0 mV (unten).

S2 **Schaltparameter aller verwendeten Nav-Kanalkonstrukte**

Tabelle 1 Schaltparameter aller verwendeten Wildtyp-Kanäle, Chimären und Kanal-Mutanten exprimiert in Neuro-2A Zellen in Gegenwart von 300 nM TTX.

Kanal	Aktivierung		Gleichgewichtsinaktivierung				Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung			
	V _m (mV)	k _m (mV)	n	V _h (mV)	k _h (mV)	n	τ ₁ (ms)	τ ₂ (ms)	a ₁ /(a ₁ +a ₂)*100	n
rNav _{1.4}	-36.0 ± 0.7	8.2 ± 0.4	27	-69.0 ± 0.8	4.4 ± 0.1	23	1.1 ± 0.1	21.7 ± 2.8	93.3 ± 0.8	9
rNav _{1.4} IFC	-30.5 ± 1.5	10.4 ± 0.5	5	-62.4 ± 3.8	5.9 ± 1.0	3				
rNav _{1.8}	-10.1 ± 1.3	19.0 ± 0.9	34	-62.2 ± 1.3	8.3 ± 0.3	29	3.9 ± 0.7	37.0 ± 11.7	59.7 ± 6.9	6
rNav _{1.8} IFC	-12.9 ± 1.7	18.5 ± 0.8	20	-57.6 ± 2.9	11.1 ± 0.7	12				
hNav _{1.8}	-16.2 ± 1.4	18.4 ± 0.5	30	-76.1 ± 1.3	8.0 ± 0.3	27	3.5 ± 0.5	23.8 ± 3.0	51.0 ± 1.2	15
hNav _{1.8} IFC	-13.0 ± 2.9	23.8 ± 2.2	7							
8444	-22.8 ± 1.9	12.6 ± 1.0	12	-61.5 ± 2.1	5.5 ± 0.3	11	1.7 ± 0.3	12.9 ± 3.4	84.3 ± 4.7	11
8444IFC	-18.0 ± 1.0	14.6 ± 0.8	10	-50.8 ± 1.5	8.5 ± 1.1	7				
4844	-13.6 ± 1.8	16.5 ± 0.6	16	-66.7 ± 1.5	5.0 ± 0.4	14	1.5 ± 0.1		100	11
4844IFC	-2.6 ± 2.9	19.9 ± 0.2	7	-56.1 ± 2.7	6.7 ± 0.9	4				
4844IFC_QG	-15.3 ± 2.6	16.7 ± 0.7	7	-54.2 ± 1.2	5.7 ± 0.2	6				
4844IFC_NV	-17.0 ± 2.1	16.6 ± 0.5	5	-52.8 ± 2.1	5.2 ± 0.7	5				
4484	-41.3 ± 0.9	11.3 ± 0.5	19	-66.0 ± 1.3	5.3 ± 0.2	19	1.1 ± 0.1	65.0 ± 36.4	89.5 ± 1.2	18
4484IFC	-40.5 ± 1.4	10.9 ± 0.5	6	-57.5 ± 0.1	5.5 ± 0.9	3				
4448	-26.9 ± 1.6	15.6 ± 0.9	15	-80.2 ± 3.1	6.9 ± 0.7	11	7.0 ± 1.7		100	6
4448IFC	-29.2 ± 0.7	13.8 ± 0.9	6	-75.4 ± 0.8	7.2 ± 0.6	6				
8844	-14.7 ± 1.2	12.0 ± 0.7	19	-55.0 ± 1.5	5.8 ± 0.2	14	1.5 ± 0.1	36.9 ± 12.0	93.0 ± 1.0	8
8844IFC	-12.6 ± 1.7	13.5 ± 0.2	5	-42.7 ± 1.4	9.0 ± 0.9	4				
4488	-34.1 ± 1.3	12.5 ± 0.5	8	-72.9 ± 1.3	6.8 ± 0.2	8	1.7 ± 0.1	13.2 ± 1.1	71.0 ± 2.0	6
4488IFC	-31.7 ± 0.9	11.9 ± 0.6	5	-66.2 ± 0.6	9.2 ± 0.2	5				

r4(KKC)	-32.2 ± 1.3	8.0 ± 0.7	7	-63.1 ± 1.2	4.7 ± 0.2	7	0.9 ± 0.1	13.5 ± 2.7	89.1 ± 2.2	6
r4(KKC)IFC	-33.3 ± 2.2	7.9 ± 0.4	6	-59.0 ± 2.8	4.8 ± 0.3	6				
r4(C)	-34.6 ± 1.2	6.8 ± 0.4	6	-65.7 ± 1.4	4.1 ± 0.1	6	1.0 ± 0.1	19.0 ± 2.1	91.9 ± 0.7	6
r4(C)IFC	-35.5 ± 1.2	6.5 ± 0.3	10	-59.4 ± 1.2	4.9 ± 0.2	8				
r4(KKCKK)	-23.1 ± 1.8	10.7 ± 0.6	5	-63.3 ± 1.3	4.5 ± 0.2	5	0.7 ± 0.0	8.1 ± 1.8	91.2 ± 0.0	2
r4(KKCKK)IFC	-23.9 ± 1.3	9.8 ± 0.4	6	-60.0 ± 1.3	4.9 ± 0.2	6				
r4(KK2)	-28.1 ± 1.5	10.7 ± 0.5	10	-69.5 ± 1.5	4.6 ± 0.3	9	1.1 ± 0.1	18.9 ± 9.3	88.7 ± 4.3	6
r4(KK2)IFC	-26.3 ± 1.0	9.6 ± 0.6	10	-58.6 ± 1.2	4.8 ± 0.3	10				
r8(QG)	-8.5 ± 0.9	17.2 ± 0.7	10	-59.3 ± 0.9	7.4 ± 0.3	10				
r8(QG)IFC	-11.4 ± 2.4	17.0 ± 0.8	4	-54.8 ± 1.3	10.7 ± 1.2	4				
r8(S)	-8.4 ± 1.6	17.2 ± 0.7	4							
r8(NV)	-15.8 ± 0.8	17.5 ± 0.8	14	-63.1 ± 0.7	7.8 ± 0.3	14	1.8 ± 0.1	14.4 ± 1.7	58.4 ± 3.4	14
r8(NV)IFC	-19.7 ± 1.7	14.2 ± 0.8	6	-59.3 ± 2.3	9.3 ± 0.7	6				
r8(QGNV)	-21.3 ± 0.8	16.1 ± 1.0	7	-65.2 ± 1.2	6.5 ± 0.2	7	1.9 ± 0.4	17.0 ± 3.4	69.9 ± 5.2	3
r8(QGNV)IFC	-14.7 ± 1.4	17.3 ± 1.4	6	-57.5 ± 1.7	9.4 ± 1.3	3				
4448-EN	-34.3 ± 1.6	13.7 ± 0.8	5	-80.5 ± 1.7	7.3 ± 0.5	5	2.3 ± 0.6	22.3 ± 6.2	72.6 ± 7.8	4
4448+V	-30.3 ± 1.8	11.4 ± 1.0	3	-81.8 ± 1.0	5.5 ± 0.4	3	3.0 ± 0.4	29.3 ± 7.2	77.6 ± 5.8	3
44(p8)4	-43.9 ± 2.4	6.7 ± 0.4	4	-71.0 ± 2.1	5.0 ± 0.0	4				

Tabelle 2 Inaktivierungsindex ($1 - I_{10ms}/I_{max}$) von IFM und IFC Kanälen unter Kontrollbedingungen.

Kanal	10 ms – Inaktivierungsindex	<i>n</i>
rNa _v 1.8-IFM	0.689 ± 0.024	34
rNa _v 1.8-IFC	0.533 ± 0.048	14
rNa _v 1.4-IFM	0.995 ± 0.001	24
rNa _v 1.4-IFC	0.964 ± 0.021	5
hNa _v 1.8-IFM	0.684 ± 0.010	5
hNa _v 1.8-IFC	0.304 ± 0.056	7
4448-IFM	0.957 ± 0.006	13
4448-IFC	0.936 ± 0.019	6
4484-IFM	0.980 ± 0.004	15
4484-IFC	0.939 ± 0.008	6
4844-IFM	0.972 ± 0.006	14
4844-IFC	0.855 ± 0.055	6
8444-IFM	0.966 ± 0.005	11
8444-IFC	0.933 ± 0.010	10
8844-IFM	0.958 ± 0.008	16
8844-IFC	0.912 ± 0.021	5
4488-IFM	0.921 ± 0.009	8
4488-IFC	0.912 ± 0.022	5

Tabelle 3 Aktivierungsparameter der Na_v-IFC Kanäle nach Applikation von 100 µM DTNP.

Kanal	Aktivierung		<i>n</i>
	V _m (mV)	k _m (mV)	
rNa _v 1.4IFC+DTNP	-37.3 ± 2.2	9.1 ± 0.5	5
rNa _v 1.8 IFC (2011)+DTNP	-24.0 ± 2.0	10.1 ± 0.5	20
hNa _v 1.8IFC+DTNP	-21.3 ± 2.4	10.3 ± 0.8	13
8444IFC+DTNP	-21.0 ± 1.4	10.0 ± 0.5	10
4844IFC+DTNP	-18.5 ± 1.5	10.4 ± 0.8	14
4844IFC_QG+DTNP	-26.7 ± 1.7	7.5 ± 0.9	6
4844IFC_NV+DTNP	-26.3 ± 1.7	8.8 ± 0.4	5
4484IFC+DTNP	-44.1 ± 1.2	8.2 ± 0.5	6
4448IFC+DTNP	-41.9 ± 1.2	10.9 ± 0.4	9
8844IFC+DTNP	-17.0 ± 1.1	8.8 ± 0.2	5
4488IFC+DTNP	-43.6 ± 0.9	8.4 ± 0.8	5
r4(KKC)IFC+DTNP	-40.0 ± 2.2	5.4 ± 0.6	5
r4(C)IFC+DTNP	-42.7 ± 1.2	4.9 ± 0.4	4
r4(KKCKK)IFC+DTNP	-33.1 ± 1.9	4.8 ± 0.3	5
r4(KK2)IFC+DTNP	-32.0 ± 1.1	6.3 ± 0.8	7
r8(QG)IFC+DTNP	-24.5 ± 2.1	9.6 ± 1.1	7
r8(NV)IFC+DTNP	-26.9 ± 2.4	8.3 ± 1.1	8
r8(QGNV)IFC+DTNP	-26.5 ± 1.2	8.5 ± 0.7	7

S3 Toxin-Effekte

Tabelle 4 Effekt von 400 nM MrVIA auf den Spitzenstrom von Na_v-Kanälen bei Depolarisation auf 0 mV.

Kanal (Expressionssystem)	τ _{on} (s)	Block (%)	<i>n</i>
rNa _v 1.4 (N2A)	5.9 ± 1.0	78.3 ± 2.6	10
rNa _v 1.8 (N2A)	7.4 ± 1.0	63.3 ± 2.1	9
hNa _v 1.8 (N2A)	8.2 ± 1.4	46.5 ± 2.3	5
r8888c4 (N2A)	13.5 ± 2.4	63.8 ± 4.5	3
rNa _v 1.4 (HEK)	4.7 ± 0.5	72.4 ± 3.3	6
hNa _v 1.4 (HEK)	21.0 ± 3.3	61.8 ± 2.5	6
r8888c4 (HEK)	6.2 ± 1.7	71.9 ± 4.2	6
h8888c4 (HEK)	7.7 ± 1.2	59.7 ± 1.2	3
rNa _v 1.8-QG (N2A)	23.2 ± 7.8	73.6 ± 6.7	6
rNa _v 1.8-NV (N2A)	18.9 ± 4.8	88.6 ± 1.6	6
rNa _v 1.8-QGNV (N2A)	13.0 ± 2.3	92.9 ± 1.7	5
rNa _v 1.4-KK2 (N2A)	12.0 ± 5.2	74.8 ± 5.1	6
rNa _v 1.4-KKCKK (N2A)	10.4 ± 8.5	79.6 ± 5.9	4
rNa _v 1.4-E1251N (HEK)	7.0 ± 1.1	53.8 ± 3.5	5
rNa _v 1.4-K1252V (HEK)	23.7 ± 5.2	55.9 ± 7.2	3
rNa _v 1.4-E1254L (HEK)	20.1 ± 4.3	49.8 ± 7.2	6
rNa _v 1.4-H1257K (HEK)	9.8 ± 2.9	79.5 ± 3.4	4
rNa _v 1.4-V1260D (HEK)	21.4 ± 6.1	42.2 ± 5.9	5
44(p5)4 (HEK)	23.9 ± 12.6	79.0 ± 6.7	4
44(p6)4 (HEK)	110.0 ± 101.0	51.2 ± 6.9	2

44(p7)4 (HEK)	27.3 ± 5.0	22.9 ± 6.1	5
44(p8)4 (HEK)	28.0 ± 6.0	65.8 ± 3.2	6

Tabelle 5 Effekt von 2 μM SVIE auf Na_v -Kanäle exprimiert in Neuro-2A Zellen. Zeitkonstante und Normalisierter Inaktivierungsindex wurden bei Depolarisation auf 0 mV ermittelt. Änderungen in der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Gleichgewichtsinaktivierung nach Toxinapplikation sind als Differenz zu Kontrollbedingungen angegeben.

Kanal	τ_{on} (s)	Norm. $I_{5\text{ms}}/I_{\text{max}}$	ΔV_{m} (mV)	Δk_{m} (mV)	ΔV_{h} (mV)	Δk_{h} (mV)	n
rNa _v 1.4	15.8 ± 2.1	39.8 ± 4.7	-13.3 ± 1.7	-0.6 ± 1.2	-7.4 ± 4.1	1.9 ± 0.6	12
rNa _v 1.8	20.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2	-5.6 ± 1.3	1.3 ± 3.7	-5.3 ± 7.4	1.9 ± 1.1	4
8844	8.3 ± 3.6	2.2 ± 0.4	-9.1 ± 4.6	-0.5 ± 3.0	-4.7 ± 7.6	3.4 ± 0.9	5
8444	6.1 ± 2.5	2.8 ± 1.0	-7.5 ± 5.8	0.6 ± 1.9			5
4844	10.5 ± 5.5	13.1 ± 3.1	-12.5 ± 8.0	-2.7 ± 2.5	6.0 ± 3.5	7.4 ± 0.5	5
4484	14.4 ± 3.6	3.3 ± 1.0	-9.0 ± 3.4	-0.3 ± 1.2	-8.1 ± 3.5	0.2 ± 0.4	6
4448	32.1 ± 18.8	0.9 ± 0.2	-6.0 ± 5.0	-1.2 ± 3.5	-5.6 ± 15.5	-0.3 ± 0.6	4
44(p8)4	27.0 ± 10.8	19.0 ± 4.4	-12.9 ± 5.2	-0.9 ± 1.1	-11.9 ± 0.5	1.0 ± 0.3	4
4448-EN	20.0 ± 0.0	1.3 ± 0.1	-7.3 ± 4.5	-2.5 ± 1.1	-5.7 ± 3.6	-0.6 ± 1.0	5
4448+V	20.0 ± 0.0	1.3 ± 0.3	-8.7 ± 4.4	-0.2 ± 2.2	-12.0 ± 2.7	0.0 ± 0.8	3

Tabelle 6 Effekt von 20 nM LqhII auf Na_v -Kanäle exprimiert in ND7/23-Zellen. Zeitkonstante und normierter Inaktivierungsindex wurden bei Depolarisation auf 0 mV ermittelt

Kanal	$\tau_{\text{on}1}$ (s)	$\tau_{\text{on}2}$ (s)	Norm. $I_{5\text{ms}}/I_{\text{max}}$	ΔV_{m} (mV)	n
rNa _v 1.4	26.4 ± 5.0	626 ± 296	38.5 ± 5.2	-13.5 ± 1.2	7
8844	9.6 ± 1.1	346 ± 131	3.4 ± 0.7	-7.2 ± 1.6	5
4488	70.3 ± 47.2		1.0 ± 0.1		3
8444	21.8 ± 4.9	132 ± 37	2.7 ± 0.4		6

S4 Inaktivierungsmodifikation von Na_v -Kanälen

Tabelle 7 Effekt von 10 μM Chloramin-T auf Na_v -Kanäle exprimiert in Neuro-2A Zellen ermittelt bei Depolarisation auf 0 mV.

Kanal	Rel. Reststrom	Inaktivierungsindex		n
	nach 200 s (%)	0 s	nach 450 s	
rNa _v 1.4	104.9 ± 3.2	0.995 ± 0.006	0.959 ± 0.025	4
hNa _v 1.8	41.0 ± 3.3	0.851 ± 0.024	0.734 ± 0.044	5
rNa _v 1.8-IFM	62.6 ± 4.3	0.859 ± 0.006	0.750 ± 0.034	5
rNa _v 1.8-IFL	85.2 ± 3.7	0.770 ± 0.020	0.711 ± 0.022	6
8444	42.1 ± 6.7	0.966 ± 0.005	0.802 ± 0.051	5
4844	105.8 ± 3.2	0.972 ± 0.006	0.903 ± 0.019	4
4484	82.9 ± 5.3	0.980 ± 0.004	0.905 ± 0.029	5
4448	128.3 ± 10.2	0.957 ± 0.006	0.832 ± 0.075	4
8844	34.8 ± 7.5	0.958 ± 0.008	0.819 ± 0.053	4
4488	93.2 ± 1.9	0.921 ± 0.010	0.864 ± 0.010	6

S5 Eigenschaften der C-Terminus Chimären

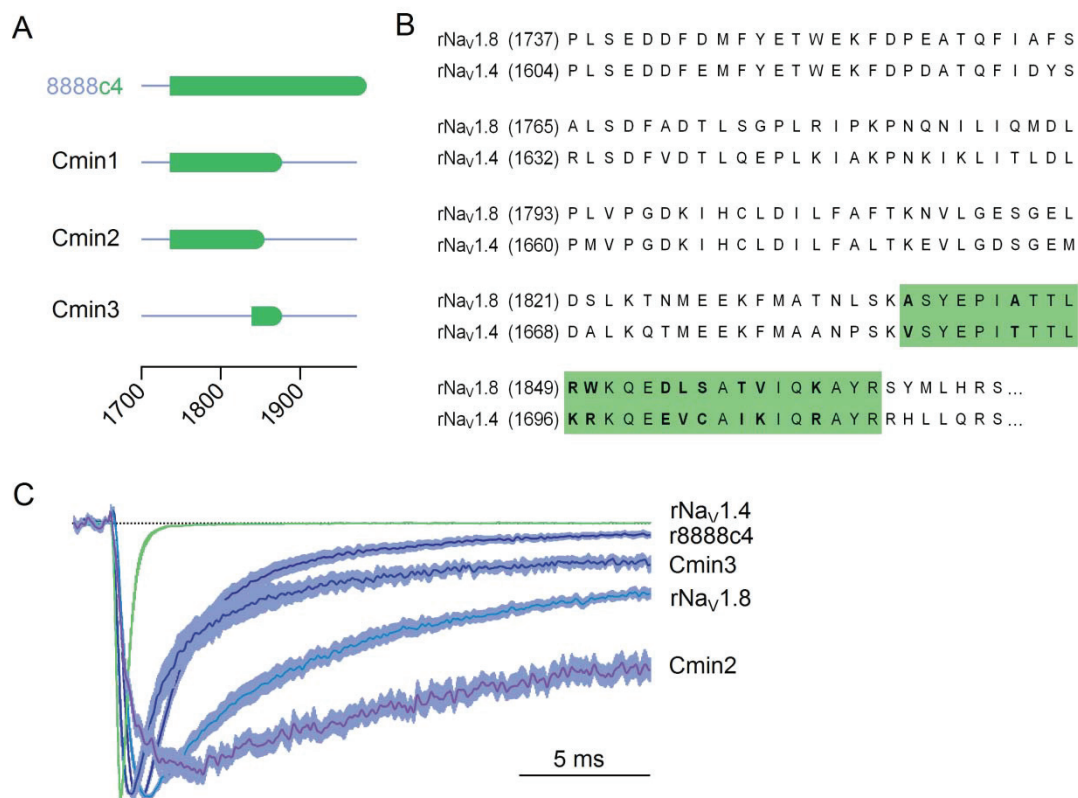


Abb. S-3 C-Terminus Chimären. **A** Skizze der Sequenzübergänge im C-Terminus mit Na_v1.8-Sequenzabschnitten (blau) und Na_v1.4-Sequenzabschnitten. **B** Aminosäuresequenzen des proximalen C-Terminus von rNa_v1.4 und rNa_v1.8. Punkte am Sequenzende markieren den Beginn des distalen C-Terminus. Die grüne Box kennzeichnet den Na_v1.4-Sequenzabschnitt in Cmin3 mit Hervorhebung der nicht konservierten Aminosäuren. **C** Stromantworten auf Depolarisation auf 0 mV gemittelt für jeweils fünf Neuro-2A-Zellen zur Veranschaulichung der Auswirkungen von Änderungen des C-Terminus auf die Inaktivierungskinetik von Na_v1.8-Kanälen.

Tabelle 8 Schalteigenschaften der C- und N-Terminus-Chimären exprimiert in Neuro-2A Zellen.

Kanal	Aktivierung			Gleichgewichtsinaktivierung		
	V _m (mV)	k _m (mV)	n	V _h (mV)	k _h (mV)	n
r8888c4	-10.3 ± 1.6	16.8 ± 0.5	8	-56.3 ± 1.4	5.5 ± 0.2	8
4n8888	-9.0 ± 0.5	20.6 ± 1.2	5	-62.1 ± 1.9	8.8 ± 0.6	4
Cmin2	-9.2 ± 1.9	29.9 ± 2.2	5	-48.6 ± 3.9	13.0 ± 2.0	4
Cmin3	-13.7 ± 3.3	21.6 ± 1.8	4	-61.7 ± 3.3	7.7 ± 0.6	4

Tabelle 9 Schalteigenschaften der C- und N-Terminus-Chimären exprimiert in HEK293 Zellen.

Kanal	Aktivierung			Gleichgewichtsinaktivierung		
	V _m (mV)	k _m (mV)	n	V _h (mV)	k _h (mV)	n
r8888c4	-16.0 ± 1.8	20.6 ± 1.4	16	-57.1 ± 1.5	6.0 ± 0.4	12
h8888c4	-24.9 ± 1.9	21.9 ± 1.2	9	-69.3 ± 0.8	6.0 ± 0.6	9
4n8888c4	-12.9 ± 1.9	19.5 ± 3.9	4			
Cmin1	-18.9 ± 3.4	22.6 ± 3.5	5	-62.4 ± 0.7	5.7 ± 0.5	4
Cmin3	-13.9 ± 6.8	31.6 ± 5.5	3			
4444c8	-34.7 ± 1.8	15.8 ± 0.9	6			